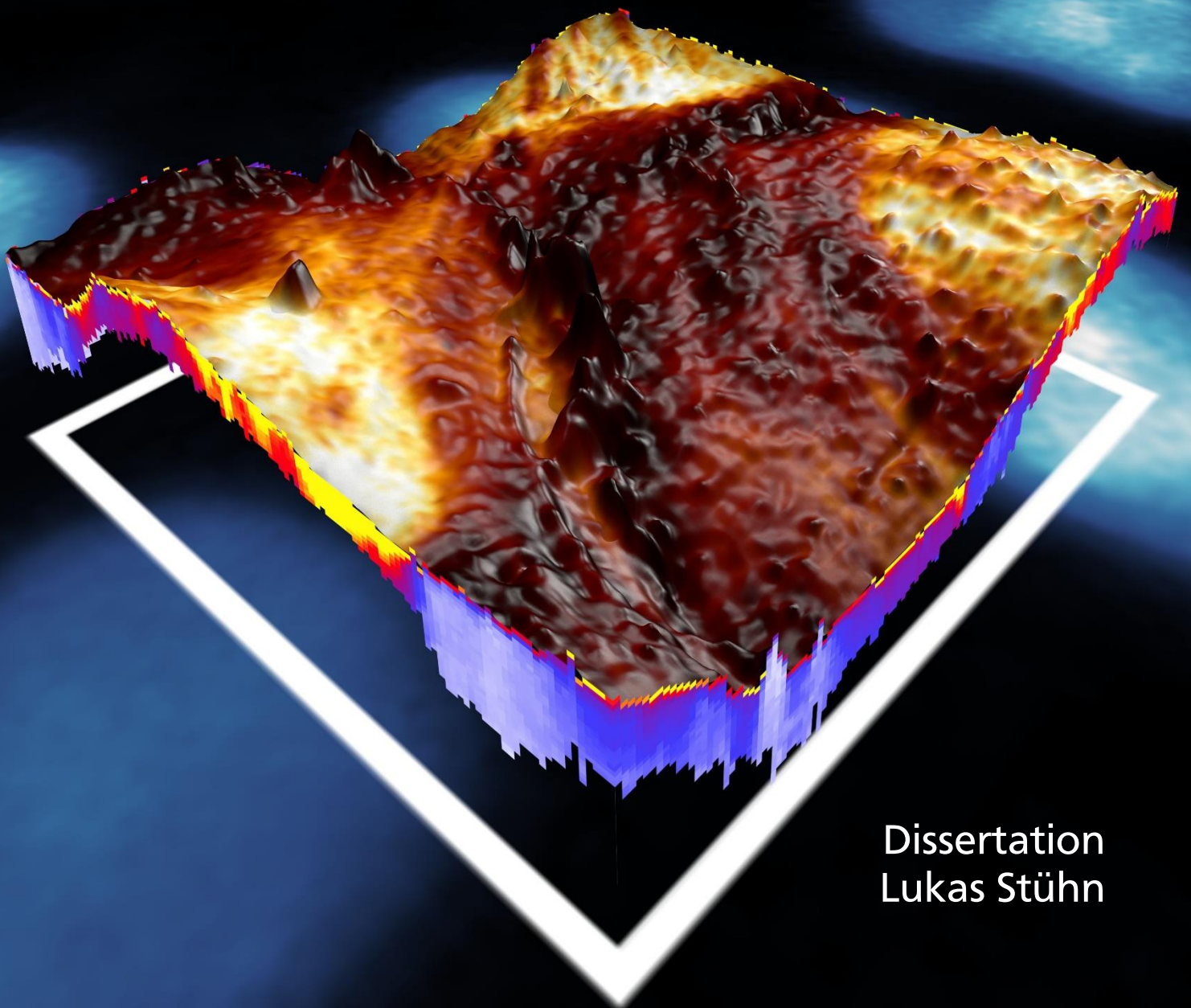


Oberflächennahe Tomografie der Nanomechanik polymerer und biologischer Materialien mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie



Dissertation
Lukas Stühn



**Physics of
Surfaces**



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

**Oberflächennahe Tomografie der Nanomechanik
polymerer und biologischer Materialien
mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie**

**Fachbereich Material- und Geowissenschaften
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation
von Lukas Stühn
aus Freiburg**

Erstgutachter: Prof. Dr. Robert Stark
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Regine von Klitzing

Darmstadt 2020

Stühn, Lukas: Oberflächennahe Tomografie der Nanomechanik polymerer und biologischer Materialien mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2021
URN: [urn:nbn:de:tuda-tuprints-173583](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:tuda-tuprints-173583) ([nbn-resolving.de](https://nbn-resolving.org/))
Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2020

Veröffentlicht unter CC BY-NC-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>

Eidesstattliche Erklärung

Die Dissertation ist von mir mit einem Verzeichnis aller benutzten Quellen versehen.
Ich erkläre, dass ich die Arbeit – abgesehen von den in ihr ausdrücklich genannten Hilfen – selbstständig verfasst habe.

Lukas Stühn

Darmstadt, den 07.01.2021

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	i
Inhaltsverzeichnis	i
Kurzzusammenfassung	4
Abstract	6
1.Einleitung	8
1.1. Inhalt und Ziel dieser Arbeit	10
1.2. Struktur dieser Arbeit	11
2.Grundlagen	13
2.1. Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops	13
2.2. Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe	15
2.3. Statische Rasterkraftmikroskopie und Artefakte	17
2.4. Dynamische Rasterkraftmikroskopie	19
2.5. Quasistatische Rasterkraftmikroskopie	23
2.6. Mechanische Charakterisierung – Kontaktmechanik	28
3.Darstellung von Strukturen unterhalb der Oberfläche	31
3.1. Oberflächennahe Volumenabbildung mit multimodaler Anregung	31
3.2. Volumenabbildung durch Kartierung von Kraft-Abstands Kurven	35
3.3. Vergleich der Methoden für Volumenabbildung	38
3.4. Weitere Methoden der Volumenabbildung	40
3.5. Zusammenfassung	41
4.Anwendung dynamischer und multimodaler Rasterkraftmikroskopie	42
4.1. Experimenteller Aufbau für frequenzmodulierte bimodale Rasterkraftmikroskopie	42
4.2. Hohe Auflösung auf großer Fläche	44
4.2.1. Experimentelles	44
4.2.2. Ergebnisse und Diskussion	45
4.3. Materialkontrast in polymergefüllten Nanoröhren	49
4.3.1. Experimentelles	49
4.3.2. Ergebnisse und Diskussion	49
4.4. Materialkontrast bei Block-Copolymeren	51
4.4.1. Experimentelles	51
4.4.2. Ergebnisse und Diskussion	52
4.5. Magnetischer Kontrast unter einer Oberfläche	55
4.5.1. Experimentelles	55
4.5.2. Ergebnisse und Diskussion	56
4.6. Zusammenfassung	58
5.Bimodale Rasterkraftmikroskopie: getrennte Untersuchung von Hülle und Kern von Ferritin	60
5.1. Einführung	60

5.2.	Experimentelles Vorgehen	60
5.3.	Ergebnisse und Diskussion	61
5.4.	Zusammenfassung	64
6.	Quasistatische Rasterkraftmikroskopie: selbstorganisierter Ab- und Aufbau der Ferritinhülle	66
6.1.	Einführung	66
6.2.	Experimentelles	67
6.2.1.	Herstellung der Proben	67
6.2.2.	Größenanalyse mittels Rasterkraftmikroskopie	67
6.3.	Ergebnisse und Diskussion	68
6.3.1.	Elektrosterische Wechselwirkungen	68
6.3.2.	Auswirkung des pH-Werts auf die Größenverteilung von Ferritin	70
6.4.	Zusammenfassung	74
7.	Untersuchung lebender menschlicher Zellen mit quasistatischer Rasterkraftmikroskopie	76
7.1.	Experimentelles	76
7.1.1.	Zellkultur	76
7.1.2.	Rasterkraftmikroskopie	77
7.2.	Ergebnisse und Diskussion	77
7.3.	Zusammenfassung	80
8.	Nanomechanische Charakterisierung von lebenden menschlichen Zellen unter der Oberfläche	81
8.1.	Einführung	81
8.2.	Experimentelles Vorgehen	82
8.2.1.	Probenherstellung und Zellkultur	83
8.2.2.	Optische Mikroskopie	83
8.2.3.	Rasterkraftmikroskopie	83
8.3.	Auswertung der Daten	84
8.4.	Ergebnisse und Diskussion	86
8.5.	Zusammenfassung	99
9.	Zusammenfassung	102
10...	Ausblick	105
10.1.	Abbildungsgeschwindigkeit und Auflösung	105
10.2.	Anwendungsvorschlag für diese Methode	106
10.3.	Kombination mit anderen Methoden	106
	Veröffentlichungen	108
	Konferenzbeiträge	110
	Betreute Arbeiten und Dank	111
	Akademischer Lebenslauf	113
	Anhang	114
	Monomodale frequenzmodulierte Rasterkraftmikroskopie	114

Annähern an die Oberfläche im externen FM-Modus	115
Abbildungsverzeichnis	117
Literaturverzeichnis	123

Die Rasterkraftmikroskopie ist im Allgemeinen eine Technik, mit der ein stark vergrößertes Abbild der Topografie einer Oberfläche erzeugt werden kann. Dabei ist es gleichzeitig möglich, Informationen über elektrische, magnetische, chemische oder mechanische Eigenschaften der Oberfläche zu erhalten.

Die Eigenschaften von sehr kleinen, also Nano-Partikeln, sind von denen der Oberfläche dominiert, da verhältnismäßig viele Atome auf der Oberfläche liegen und nicht im Volumen. Werden die Partikel größer, so ändert sich dieses Verhältnis, und die Eigenschaften des Volumens beginnen zu dominieren. Die Oberfläche ist insbesondere dadurch charakterisiert, dass sie im Kontakt zur Umwelt steht und Einflüssen wie dem Umgebungsmedium ausgesetzt ist. Zwischen dem Volumen und der Oberfläche befindet sich ein Übergangsbereich, der sowohl Einflüsse der Umwelt, wie auch des Volumens erfährt.

Die vielfältigen abbildenden Möglichkeiten der Rasterkraftmikroskopie sollen auch auf den unter der Oberfläche liegenden, oberflächennahen Bereich einer Probe angewandt werden.

Wie unter der Oberfläche liegende Strukturen mit Rasterkraftmikroskopie zugänglich gemacht werden können, ist die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

Dazu werden zwei verschiedene Vorgehensweisen gezeigt, mit denen es möglich ist, mit Rasterkraftmikroskopie nicht nur die Topografie der Oberfläche einer Probe abzubilden, sondern auch Strukturen sichtbar zu machen, die unterhalb der Oberfläche liegen. Diese Strukturen liegen im Übergangsbereich zwischen Oberfläche und Volumen. Ein komplettes, dreidimensionales Volumenabbild ist hier nicht möglich, jedoch ist es in beiden Fällen ebenfalls möglich, die Probe auch oberflächennah, orts aufgelöst mechanisch zu charakterisieren.

Im ersten Ansatz wird der Biegebalken der Messspitze des Rasterkraftmikroskops nicht nur mit seiner Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt, sondern auch mit einer oder mehreren höheren Eigenmoden. Dadurch ist es möglich, lang- und kurzreichweitige Wechselwirkungen zwischen Messspitze und Probe in einer Messung getrennt voneinander zu erfassen, wenn sich die Wechselwirkungslängen voneinander unterschei-

den. Das ist zum Beispiel der Fall, wenn es sich zum einen um langreichweitige magnetische Wechselwirkungen und zum anderen um topografieerzeugende, kurzreichweitige, abstoßende Kräfte handelt.

Im zweiten Ansatz werden an jedem Punkt der Oberfläche Kraft-Abstands Kurven aufgenommen. Aus der Analyse der Kurven kann sowohl die Topografie der Probe aus dem Kontaktpunkt erhalten werden, wie auch mechanische Eigenschaften wie der (effektive) Elastizitätsmodul und die maximale Eindringtiefe in die Probe an dem jeweiligen Punkt. Eine dreidimensionale nanomechanische Kartierung ist mit der Methode der Kraft-Abstands Kurven möglich, wenn eine spezielle Auswertung angewandt wird: dabei werden die Kurven beginnend am Kontaktpunkt stückweise, lokal ausgewertet. So können tiefenaufgelöste, mechanische Eigenschaften erhalten werden.

Das Potenzial dieses „Werkzeugs“ wird anhand von verschiedenen Beispielen demonstriert. Dazu werden polymere und magnetische Materialien sowie Nanopartikel hinsichtlich ihrer Oberflächen- und inneren Struktur sowie mechanischer Eigenschaften untersucht.

Insbesondere ist es möglich, lebende, menschliche Zellen mit dieser Methode zu untersuchen und mechanisch zu charakterisieren. Dabei können Zellbestandteile wie der Zellkern und das Zellskelett identifiziert und lokal aufgelöst werden. In Kombination mit optischer Fluoreszenzmikroskopie können die mit der Rasterkraftmikroskopie gefundenen Strukturen in der Zelle identifiziert werden. Diese Messungen zeigen eine mechanisch härtere, äußere Schicht der Zellen, die an einigen Stellen unterbrochen ist. An diesen „Löchern“ ist die Eindringtiefe der Messspitze in die Zelle deutlich erhöht und der Elastizitätsmodul vermindert. Hierbei könnte es sich um integrale Proteine handeln, die die Zellmembran durchspannen und den Stofftransport der Zelle ermöglichen.

Dieses Werkzeug könnte in Zukunft dazu genutzt werden, gezielt Vorgänge in lebenden Zellen zu untersuchen – beispielsweise das Eindringen von Nanopartikeln oder den Vergleich von Bestandteilen gesunder Zellen mit denen von Krebszellen.

Atomic force microscopy is generally a technique that can be used to create a highly magnified image of the topography of a surface. Simultaneously, it is possible to obtain information about electrical, magnetic, chemical or mechanical properties of the surface.

The properties of very small, i.e. nanoparticles are dominated by those of the surface because a relatively large number of atoms are located on the surface and not in the volume. If the particles become larger, this ratio changes and the properties of the volume begin to dominate. The surface is characterized in particular by the fact that it is in contact with the environment and is exposed to influences such as the surrounding medium. Between volume and surface there is a transition region which is influenced by both the environment and the volume.

The various imaging possibilities of atomic force microscopy are also to be applied to the area of a sample that lies below the surface and is close to the surface.

The central question of this work is how to make sub-surface structures accessible with atomic force microscopy.

For this purpose, two different approaches are shown, with which it is possible to use atomic force microscopy not only to image the topography of the surface of a sample, but also to visualize structures that lie below the surface. These structures are located in the transition region between surface and volume. A complete, three-dimensional image of the volume is not possible here, but in both cases it is also possible to locally characterize the sample mechanically close to the surface.

In one case, the cantilever of the probe of the atomic force microscope is excited to oscillate not only with its resonant frequency, but also with one or more higher eigenmodes. This allows for measuring short- and long-range interactions between probe tip and sample separately in one measurement if the interaction lengths differ from each other. This is the case, for example, if there are long-range magnetic interactions on the one hand and topographical short-range repulsive forces on the other hand. In the second case, force-distance curves are mapped two dimensionally during the measurement. From these curves the topography of the sample can be reconstructed from the contact point as well as mechanical properties such as the Young's modulus

and the maximum indentation depth into the sample can be visualized. A three-dimensional nanomechanical characterization is possible with the method of force-distance curves, if a special data analysis is applied: the curves are evaluated section by section, locally, starting at the contact point. In this way depth-resolved mechanical properties can be obtained.

The potential of this "tool" are demonstrated by means of various examples. For this purpose, both polymeric and magnetic materials as well as nanoparticles are investigated towards their surface and inner structure, as well as their mechanical properties. In particular, it is possible to examine and mechanically characterize living human cells with this method. Cell components such as the cell nucleus and the cytoskeleton can be identified and resolved. In combination with optical fluorescence microscopy, the structures found by nanomechanical characterization can be identified in the cell. These measurements show a mechanically harder, outer layer of the cells, which is interrupted at some places. At these cavities the indentation depth of the probe tip into the cell is significantly increased and the Young's modulus is reduced compared to the surrounding area. These could be integral proteins that span the cell membrane and enable the mass transport of the cell.

In the future, this tool could be used to study specific processes in living cells - for example the intrusion of nanoparticles into the cell or the comparison of structures in healthy cells with cancer cells.

1. Einleitung

Produkte, die Materialeigenschaften auf der Nanometerskala ausnutzen begegnen uns im Alltag immer häufiger: in Lebensmitteln wird Siliziumdioxid als Rieselhilfe eingesetzt [1], in Verpackungsmaterialien wirken Silbernanopartikel antibiotisch [2-4], Titandioxidnanopartikel machen durchsichtige Schichten für UV-Strahlung undurchlässig [5], nanoskalige Tonpartikel erhöhen die Steifigkeit von Kunststoffen [6], Nanokäfige werden zum Transport von Nahrungsergänzungsmitteln oder Medikamenten [7-11] eingesetzt. In diesen Fällen wird ausgenutzt, dass die Größe der Partikel deren Eigenschaften bedingt: Je kleiner das Partikel, desto mehr dominieren die Eigenschaften der Oberfläche im Vergleich zu denen des Volumens. Das ist anschaulich in **Abbildung 1** zu sehen:

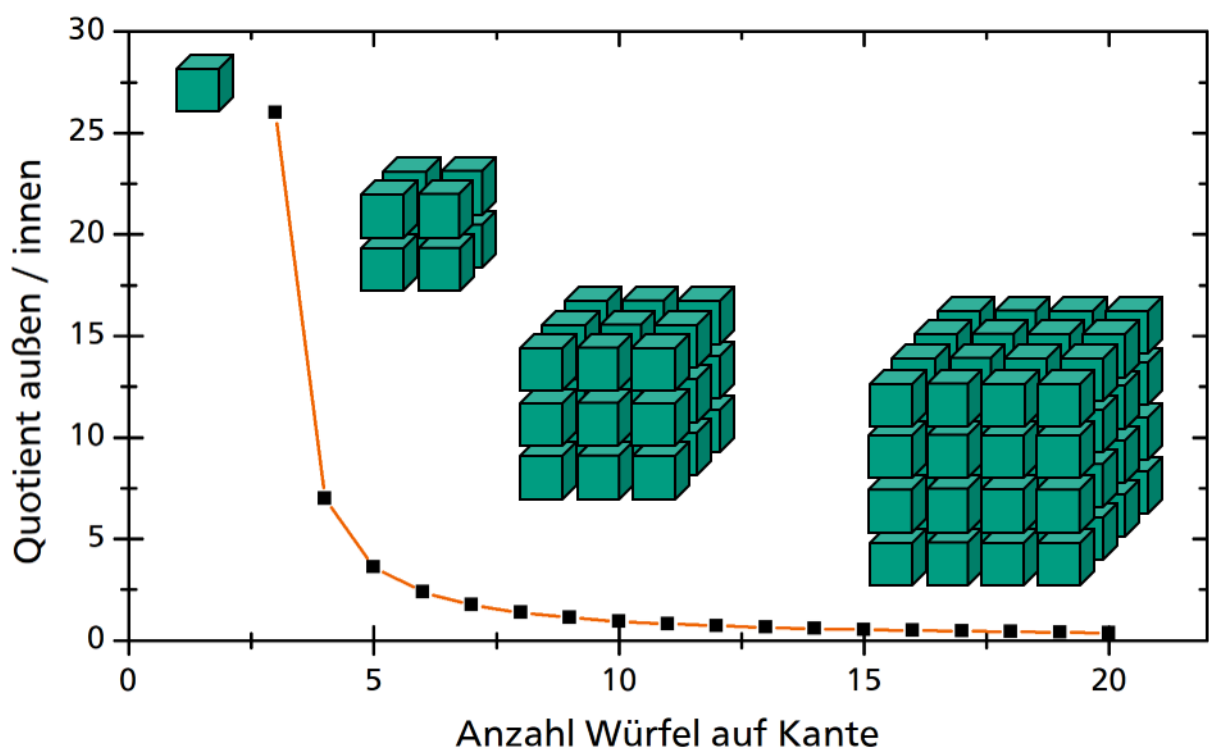


Abbildung 1 Die Quader bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl an Teilwürfeln. Je kleiner die Anzahl an Teilwürfeln ist, desto größer ist die Anzahl der Würfel, die an der Oberfläche sitzen, im Vergleich zu denen im Volumen.

Ein Würfel wird aus elementaren Teilwürfeln aufgebaut. Je kleiner die Zahl der Bausteine, umso mehr dominieren die an der Oberfläche liegenden Bausteine die Eigenschaften des Würfels.

Erste Ideen, die kleine Größe und das damit verbundene große Verhältnis von Oberfläche zu Volumen auszunutzen, gibt es seit den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts. Als wegweisend gilt der von Richard Feynman gehaltene Vortrag "*There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics*" (so ähnlich wie: "Unten ist eine Menge Platz: eine Einladung, ein neues Feld der Physik zu betreten", 29.12.1959) [12]. Der Begriff „Nanotechnologie“ für dieses Wissenschaftsfeld wurde später geprägt und gelangte durch Eric Drexlers Buch „*Engines of Creation*“ [13] in eine breite Öffentlichkeit. Die Nanotechnologie beschäftigt sich mit Forschung und Technologie auf Größenskalen von einzelnen Atomen bis hin zu 100 nm und entwickelt bzw. studiert neue Eigenschaften von Materialien aufgrund der geringen Größe der Nanoobjekte. Eigenschaften, die sich unterhalb einer „kritischen Größe“ verändern, sind beispielsweise mechanische Eigenschaften (wie die Adhäsion), optische Eigenschaften (wie die Absorption von Licht), die Plasmonenresonanz (und damit die „Farbe“ von Nanoteilchen [14, 15]) oder magnetische Eigenschaften (wie Superparamagnetismus, also keine dauerhafte Magnetisierung ohne ein externes Feld auch unterhalb der Curie-Temperatur). Der Alltagseinsatz von Nanomaterialien und Nanopartikeln ist nicht unumstritten [1]: neben den veränderten Materialeigenschaften weisen Nanopartikel eine höhere chemische Reaktivität, eine größere biologische Aktivität und ein stärkeres katalytisches Verhalten auf. Aufgrund ihrer kleinen Größe können Nanopartikel Zellmembranen durchdringen und sogar in den Zellkern eindringen und womöglich toxisch wirken [16-19]. Um die „Nanowelt“ zu untersuchen, sind Werkzeuge notwendig, die eine Vergrößerung erreichen, die es erlaubt, einzelne Nanopartikel und deren Umgebung sichtbar zu machen. Der Wunsch ist also, ein bildgebendes Verfahren mit einer räumlichen Auflösung im Nanometerbereich zu haben. Da die zu untersuchenden Strukturen im Allgemeinen deutlich kleiner sind als sichtbares Licht, sind konventionelle optische Mikroskope nicht als Werkzeuge geeignet. Streuverfahren wie Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. SAXS, small angle x-ray scattering) oder Neutronenkleinwinkelstreuung (engl. SANS, small angle neutron scattering) bieten eine entsprechende räumliche Auflösung, bilden aber immer ein Volumenmittel ab und sind daher ungeeignet, einzelne Strukturen zu beobachten.

Die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops (engl. STM, scanning tunneling microscope) [20, 21] durch Gerd Binnig und Heinrich Rohrer im Jahr 1982 machte es erstmals möglich, eine Kristalloberfläche so genau abzubilden, dass einzelne Atome

sichtbar wurden [22-25]. Hier wurde eine leitfähige Spitze über eine Probenoberfläche gerastert und der Abstand zwischen Spitze und Oberfläche immer so eingestellt, dass ein konstanter Tunnelstrom fließt. Der Tunnelstrom wird in diesem Fall also als Regelgröße genutzt, um die Topografie einer Oberfläche abzubilden. Aus der zugrundeliegenden Idee, die Oberfläche einer Probe mit einer sehr scharfen Spitze in sehr geringem Abstand abzurastern, entstanden weitere Typen der „Rastersonden-Mikroskope“ (engl. SPM, scanning probe microscope). Das Rasterkraftmikroskop (engl. AFM, atomic force microscope) benutzt ebenso eine scharfe Spitze, die am Ende eines Biegebalkens befestigt ist [26]. Die von der Probenoberfläche aus auf diese Spitze wirkenden Kräfte führen zu einer Verbiegung des Biegebalkens. Diese Verbiegung kann als Regelsignal verwendet und somit auch hier ein Abbild der Topografie der Probenoberfläche erstellt werden. Neben diesem sehr einfachen Betriebsprinzip sind weitere physikalische Größen als Regelsignal verwendbar: Wird der Biegebalken extern zu einer (resonanten) Schwingung angeregt, so kann die Amplitude dieser Schwingung („AM-AFM“), die Phasenverschiebung zwischen Anregung und Antwort des Biegebalkens oder auch die Frequenzverschiebung („FM-AFM“) als Regelgröße dienen [27, 28]. Der Betrieb eines Rasterkraftmikroskops mit diesen Methoden wird als „Dynamische Rasterkraftmikroskopie“ bezeichnet. Es sind auch Mischformen der Betriebsmodi möglich, mit denen erstmals eine mechanische Materialcharakterisierung möglich war [29]. Ebenso ist es möglich, den Biegebalken mit mehreren Schwingungen gleichzeitig anzuregen. Diese „Multimodale Rasterkraftmikroskopie“ bietet eine noch höhere Auflösung und Sensitivität gegenüber Materialeigenschaften und insbesondere wird nur eine Schwingung als Regelgröße benötigt – alle weiteren sind frei von Einschränkungen durch die Regelung [30].

1.1. Inhalt und Ziel dieser Arbeit

Alle diese genannten Methoden geben zunächst ein vergrößertes Abbild der Probenoberfläche wider. Der oberflächennahe Bereich einer zu untersuchenden Probe ist geprägt sowohl von Einflüssen der Umwelt, wie auch von denen des Volumens. Hier finden zum Beispiel Transportprozesse von der Umgebung in das Volumen statt. Dazu gehört auch das Eindringen von Nanopartikeln in lebende menschliche Zellen. Um aber beispielsweise die Wechselwirkungen der oben genannten Nanopartikel und lebendem

Gewebe zu untersuchen, ist es notwendig, diese auch unter der Probenoberfläche sichtbar machen zu können. Verschiedene komplexe Methoden wurden bereits verwendet, um unter die Oberfläche schauen zu können. Ein Beispiel ist die Rasternahfeld-Ultraschall-Holografie (engl. SNFUH, scanning near-field ultrasound holography) [31]. Hier werden Ultraschallwellen durch die zu messende Probe geleitet, welche im Inneren der Probe an verschiedenen Strukturen streuen. Diese gestreuten Wellen werden mit dem Biegebalken aufgenommen und in Bezug auf Amplitude und Phase der ursprünglichen Schwingung ausgewertet. Dies erlaubt Rückschlüsse auf die innere Struktur der Probe zulässt.

Obwohl die „klassische“ Rasterkraftmikroskopie grundsätzlich eine oberflächensensitive Messmethode ist, lässt sich auch mit der „klassischen“ Rasterkraftmikroskopie das Innere einer Probe sichtbar machen [32].

Ziel dieser Arbeit ist es, zu zeigen, wie mit Rasterkraftmikroskopie der oberflächennahe Bereich einer Probe untersucht werden kann und dadurch Strukturen unter der Oberfläche charakterisiert werden können.

Zwei unterschiedliche Herangehensweisen sind hier möglich: bei Verwendung multimodaler Anregung in der Rasterkraftmikroskopie ist es möglich, Kräfte aufgrund ihrer Wechselwirkungslängen zu unterscheiden und dies zu nutzen, um Strukturen unter der Probenoberfläche sichtbar zu machen. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer detaillierten Auswertung von statischen oder dynamischen Kraft-Abstands Kurven. Beide Varianten werden hier gegeneinander diskutiert und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit für die Untersuchung von biologischen Proben untersucht.

1.2. Struktur dieser Arbeit

In Kapitel 2 dieser Arbeit werden die Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie beschrieben und die Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops erklärt. Dabei wird auf die verschiedenen Betriebsmodi eingegangen und die Aufnahme von Kraft-Abstands Kurven erläutert sowie die auswertbaren Größen erklärt. Die beiden unterschiedlichen Herangehensweisen, Strukturen unterhalb der Oberfläche sichtbar zu machen, werden in Kapitel 3 diskutiert. Kapitel 4 beschäftigt sich mit der exemplarischen Anwendung multimodaler Rasterkraftmikroskopie und demonstriert die hohe Auflösung und Geschwin-

digkeit dieser Methode. Wie mit multimodaler Rasterkraftmikroskopie unter die Oberfläche einer Probe geblickt werden kann, ist Bestandteil von Kapitel 5. Hier wird das körpereigene Kern-Hülle Protein Ferritin untersucht. Die zweite Möglichkeit, mit dem Rasterkraftmikroskop unter die Oberfläche zu schauen, wird durch ein methodisches Beispiel in Kapitel 6 eingeleitet: Der Ab- und der Aufbau der Hülle von Ferritin wird mit kraft-abstandkurvenbasierter Rasterkraftmikroskopie sichtbar gemacht. In Kapitel 7 wird gezeigt, dass diese Methode sehr gut zum Abbilden lebender menschlicher Zellen geeignet ist. Weiterhin wird in Kapitel 8 gezeigt, dass es möglich ist, Strukturen, die in der Zelle liegen, mechanisch sichtbar zu machen. Eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit wird in Kapitel 9 gegeben. Kapitel 10 gibt einen Ausblick auf mögliche bzw. kommende Forschungsvorhaben.

Ein Teil der Ergebnisse wurde in internationalen, begutachteten Zeitschriften veröffentlicht: die Veröffentlichungen [33, 34] sind Bestandteil von Kapitel 4, [35] ist Inhalt von Kapitel 5 und Kapitel 6, Kapitel 7 basiert auf Veröffentlichung [36] und Kapitel 8 auf Veröffentlichung [37].

2. Grundlagen

2.1. Funktionsprinzip des Rasterkraftmikroskops

Die Rasterkraftmikroskopie basiert auf einem einfachen Grundprinzip: mit einer feinen Spitze wird die Oberfläche der Probe mechanisch Zeile für Zeile abgerastert und dadurch ein Abbild der Topografie der Probe erstellt. Dieses Prinzip ist in **Abbildung 2** dargestellt

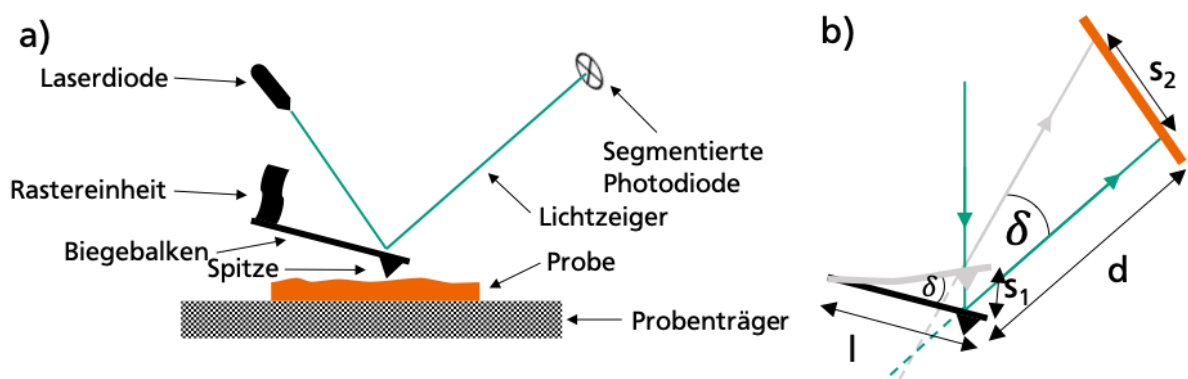


Abbildung 2 Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops. Der allgemeine Aufbau ist in a) gezeigt. Die Oberfläche einer Probe wird mit einer an einen Biegebalken befestigten Spitze abgerastert. Die Bewegung der Spitze erfolgt mittels einer Rastereinheit, meist einem Piezoaktuator. Die Auslenkung des Biegebalkens wird durch einen Lichtzeiger in einer segmentierten Photodiode detektiert. Der Lichtweg und wesentliche Größen zur Ermittlung der Vergrößerung können aus Abbildungsteil b) gelesen werden. Hier sind der Winkel δ und die Länge s_1 die Verbiegung des Biegebalkens, s_2 die Auslenkung gemessen an der Photodiode, l die Länge des Biegebalkens und d die Länge des Lichtwegs von der Rückseite des Biegebalkens bis zur Photodiode.

Die Spitze ist am vorderen Ende eines Biegebalkens befestigt. Die Verbiegung dieses Balkens wird mit einem Lichtzeiger gemessen. Dazu wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Biegebalkens gerichtet, der in eine (weit entfernte) segmentierte Photodiode reflektiert wird. Die Position des reflektierten Lichtstrahls auf der Photodiode und damit dessen Ausfallswinkel können gemessen werden und sind ein Maß für die Verbiegung des Biegebalkens. Es kann zwischen vertikaler Verbiegung (Diodensegmente oben und unten) und Torsion des Biegebalkens (Diodensegmente links und rechts) unterschieden werden. Das ist ein wichtiger Vorteil gegenüber anderen Detektionsmethoden, wie beispielsweise der Detektion mit einem Interferometer [38], einem Rastertunnelmikroskop [22, 26] oder unter Zuhilfenahme des Piezoelektrischen oder -resistiven Effekts [39]. Spitze und Probe können relativ zueinander in allen Raumrichtungen bewegt werden.

Das wird meistens durch Piezostellelemente als Rastereinheit realisiert, mit denen Positionen sub-nanometergenau eingestellt werden können.

Wichtige Kenngrößen des Biegebalkens (auch im Deutschen häufig „Cantilever“ genannt) sind seine Federkonstante und die Resonanzfrequenz der Biegeschwingung. Die Federkonstante wird meistens mit der „Sader-Methode“ bestimmt [40]. Dazu muss die Resonanzfrequenz und der Qualitätsfaktor des Biegebalkens bekannt sein, was einfach aus der Fouriertransformation des Signals des thermischen Rauschens des Biegebalkens bestimmt werden kann. Ebenso müssen die Abmessungen der Länge und Breite des Biegebalkens bekannt sein.

Es ist auch möglich, den Biegebalken in eine Schwingung zu versetzen. Das kann über die Rastereinheit erfolgen oder durch einen zusätzlichen Schwingungsgeber. Als Schwingungsgeber findet meistens ein Piezoelement Anwendung. Insbesondere bei Messungen in Flüssigkeit eignet sich auch eine photothermische Anregung [41] des Biegebalkens. Dabei wird ein zweiter Laser verwendet, dessen Lichtleistung moduliert werden kann. Dieser strahlt auf das feste Ende des Biegebalkens und erwärmt dort lokal das Material. Die lokale Erwärmung führt zu einer lokalen Ausdehnung des Materials und das zu einer Verbiegung des Biegebalkens (ähnlich wie beim Bimetall-Effekt), wodurch eine Schwingung erzwungen werden kann.

Die Vergrößerungswirkung des Rasterkraftmikroskops kommt insbesondere durch den Lichtzeiger zustande. Die Vergrößerung lässt sich, mit Hilfe von **Abbildung 2 b**, einfach abschätzen. Der Winkel δ und die Länge s_1 beschreiben die Verbiegung des Biegebalkens. Die an der Photodiode gemessene Länge der Verbiegung wird durch s_2 gekennzeichnet. Die Länge des Biegebalkens ist l , die Länge des Abstandes zwischen dem Auftreffpunkt des Lichtstrahls auf der Rückseite des Biegebalkens und der Photodiode ist d . Gemäß dem Strahlensatz gilt:

$$\frac{l}{d} = \frac{s_1}{s_2} \quad (1)$$

Damit ist die Vergrößerung V :

$$V \equiv \frac{s_2}{s_1} = \frac{d}{l} \quad (2)$$

Die Vergrößerung ist demnach umso stärker, je kürzer der Biegebalken ist und je größer der Abstand zwischen Auftreffpunkt des Lichtstrahls auf der Rückseite des Biegebalkens und der Photodiode ist.

2.2. Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe

Die Spitze des Biegebalkens tritt durch verschiedene Kräfte mit der Oberfläche der Probe in Wechselwirkung. Diese Kräfte unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Wirkungs-länge, ihrem Abklingverhalten gegenüber dem Abstand und ihrem Vorzeichen. Als „langreichweitige Kräfte“ können in Abständen bis zu einigen 100 nm magnetische oder elektrostatische Wechselwirkungen auftreten. Diese können sowohl anziehend als auch abstoßend wirken. Um die magnetischen Wechselwirkungen detektieren zu können, muss eine permanentmagnetische Messspitze verwendet werden, die eine definierte Magnetisierung aufweist. Elektrostatische Kräfte können auf isolierten Oberflächen auftreten: hier können Ladungen nicht abfließen und es entsteht eine Kraft nach dem Coulomb-Gesetz. Solche Kräfte können auch dann auftreten, wenn eine Oberfläche nicht isoliert ist, aber trotzdem auf einem anderen elektrischen Potential liegt. Kräfte, die als „kurzreichweitig“ bezeichnet werden, klingen in Bezug auf den Abstand schneller ab als $\propto \frac{1}{r^2}$. Van der Waals Wechselwirkungen, die durch spontane Fluktuationen der Elektronenverteilung auf Spitze und / oder Probe Dipole induzieren oder durch permanente Dipole entstehen, wirken im Allgemeinen als anziehende Kräfte. Bei noch geringerem Abstand, unter einem Nanometer, tritt ein mechanischer Kontakt ein: die Elektronenhüllen der vollbesetzten Atomorbitale beginnen sich zu überlagern und es tritt eine abstoßende Kraft auf, die letztendlich aus dem Pauli-Prinzip resultiert. Möglich ist auch, dass die Messspitze eine chemische Bindung mit einem Molekül auf der Oberfläche eingeht. Diese Kraft kann ebenso zu den kurzreichweitigen gezählt werden. Um die Summe der kurzreichweitigen Kräfte zu beschreiben, wird häufig das „Lennard-Jones Potential“ verwendet. Werden Messungen an Luft durchgeführt, können Kapillarkräfte auftreten: ist die Luftfeuchtigkeit hoch genug, ist eine hydrophile Probenoberfläche mit einem Wasserfilm bedeckt und es kann ein Meniskus zwischen Spitze und Probenoberfläche entstehen. Die wichtigsten Wechselwirkungen sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tabelle 1 Wichtige Wechselwirkungen, die zwischen Spitze und Probenoberfläche auftreten können.

Kraft	Reichweite	Richtung
Magnetische Wechselwirkung	lang	anziehend oder abstoßend
Van der Waals Wechselwirkung	kurz	anziehend
Elektrostatische Kräfte	lang	anziehend oder abstoßend
Pauli-Abstoßung	sehr kurz	abstoßend

Abhängig von den in einem jeweiligen Abstand dominierenden Wechselwirkungen können verschiedene Messregime in der Rasterkraftmikroskopie unterschieden werden. Vom Kontaktmodus bzw. dem repulsiven Modus spricht man, wenn sich die Spitze während der Messung immer im Bereich abstoßender Pauli-Wechselwirkungen befindet. Die Messregime und jeweils dominanten Wechselwirkungen sind in **Abbildung 3** verdeutlicht.

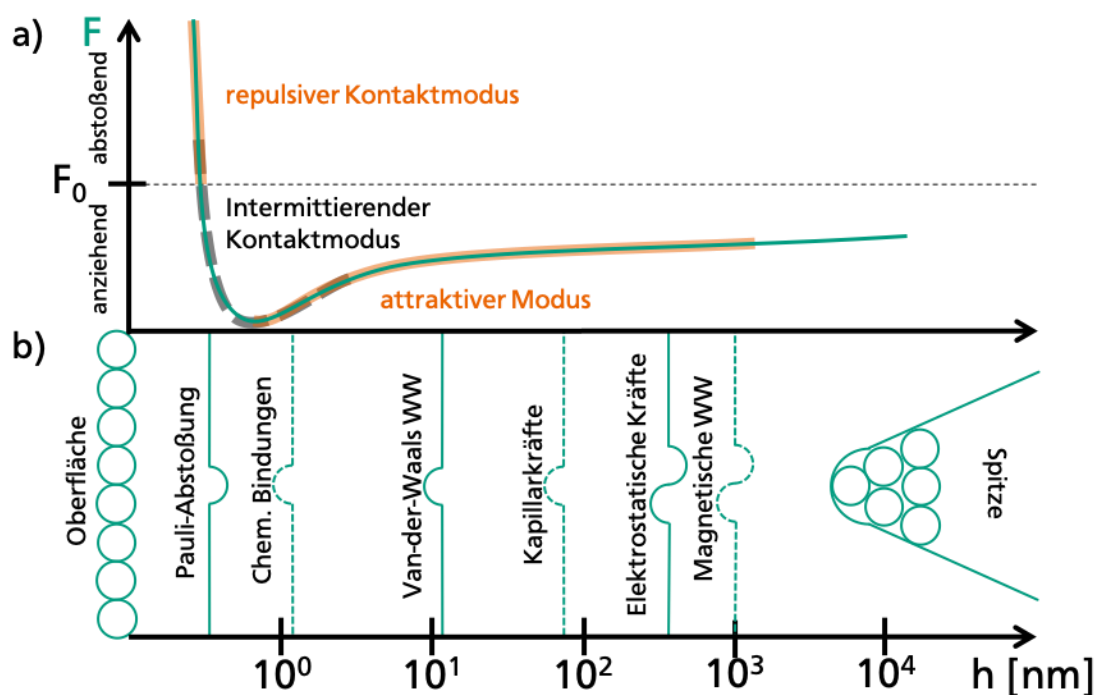


Abbildung 3 Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probenoberfläche und Messregime der Rasterkraftmikroskopie. (a) zeigt den Verlauf der wirkenden Nettokraft und die sich daraus ergebenden Messregime bzw. Betriebsmodi des Rasterkraftmikroskops (siehe auch Abschnitte 2.3, 2.4, 2.5). (b) Verdeutlicht die Reichweite und Lage der jeweiligen Wechselwirkung (erstellt nach einer Idee in: [42]).

Schwingt der Biegebalken und die Spitze erfährt während dieser Schwingung sowohl abstoßende Pauli- als auch anziehende VdW-Kräfte, so spricht man vom intermittieren-

den Kontaktmodus. Erfährt die Spitze bei einem solchen Schwingungszyklus nur attraktive Kräfte (und ist die Amplitude der Schwingung hinreichend klein), so kann von einem attraktiven Modus gesprochen werden.

2.3. Statische Rasterkraftmikroskopie und Artefakte

Im Folgenden werden die wichtigsten Betriebsmodi eines Rasterkraftmikroskops, die auch in dieser Arbeit Verwendung finden, genauer vorgestellt. Grundsätzlich unterscheiden kann man zwischen statischen und dynamischen Modi. Die statischen Betriebsmodi stellen den technisch einfacheren Fall dar.

Im einfachsten Fall wird die Spitze auf eine konstante Höhe gebracht und (relativ zueinander) über die Probe gerastert. Die dabei entstehende Verbiegung des Biegebalkens wird gemessen. Ein direktes Abbilden der Oberflächentopografie ist somit möglich, ohne dass ein Regelkreis benötigt wird. Dabei sind sowohl in der Ebene wie auch orthogonal dazu Auflösungen im sub-nanometer Bereich möglich. Jedoch können je nach Probenbeschaffenheit starke Verbiegungen und damit große Kräfte auftreten. Deshalb wird dieser Modus insbesondere für sehr glatte Proben benutzt.

In einem weiteren Fall wird bei der Messung die Kraft zwischen Spitze und Probe konstant gehalten, indem die Verbiegung des Biegebalkens (und damit die Kraft) konstant gehalten wird. Dazu wird der Abstand zwischen Spitze und Probe während des zeilenweisen Abrasterns der Oberfläche geregelt. Ein Regelkreis vergleicht die gemessene Verbiegung (Regelgröße) des Biegebalkens mit der eingestellten Verbiegung (Führungsgröße). Liegt eine Abweichung zwischen diesen Werten vor, so gleicht der Regler diese Differenz (Regelabweichung) durch eine Änderung (Stellgröße) des Abstands zwischen Spitze und Probe aus. Das Abbild der Oberfläche entsteht hier aus der Stellgröße, beziehungsweise der Höhenposition des Stellelements. Der Regelkreis arbeitet üblicherweise mit einer Parallelschaltung aus einem Proportional- und einem Integralregler. Der Proportionalregler wirkt ohne Zeitverzögerung und gibt einen Stellwert aus, der proportional zur Regelabweichung ist. Mit ihm ist es jedoch nicht möglich, die Regelabweichung vollständig zu korrigieren. Mit einem Integralregler allerdings ist eine vollständige Kompensation möglich: dieser integriert die Regelabweichungen über die Zeit auf, reagiert dadurch jedoch träge.

Während der Messung treten verschiedene Artefakte auf. Artefakte sind „scheinbare Messergebnisse“, die nur aufgrund des Messsystems selbst auftreten. Die beiden wesentlichen sind zum einen das Resultat der Trägheit des Regelkreises und zum anderen der Geometrie der Spitze geschuldet. Diese Artefakte der Messspitze sind in **Abbildung 4** beispielhaft dargestellt.

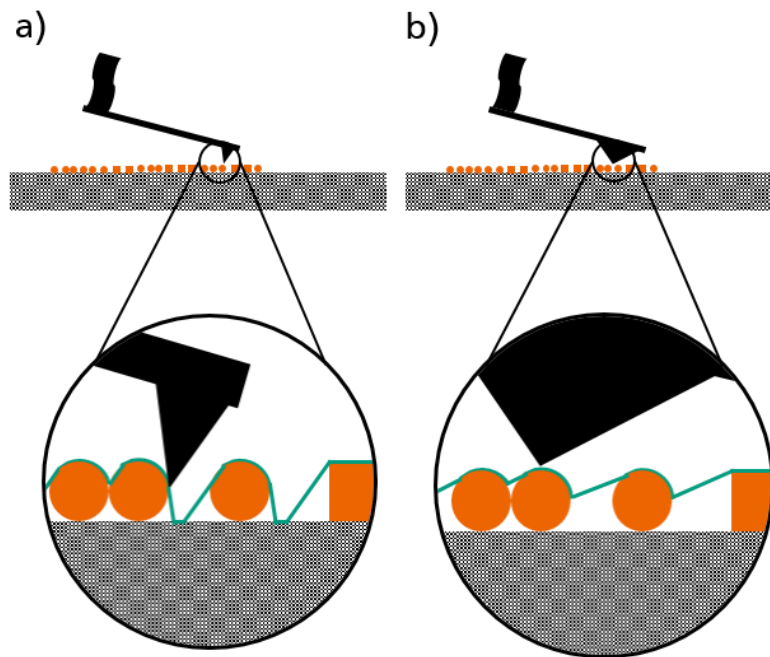


Abbildung 4 Artefakte durch die Messspitze bei der Rasterkraftmikroskopie. Die Topografie der orangenen Objekte soll abgebildet werden, die gemessene Topografie ist als grüne Linie dargestellt. Bei optimaler Geometrie und optimalem Regelkreis (a) wird die Topografie der Oberfläche fast exakt wiedergegeben. Die Geometrie der Spitze (b) verhindert eine exakte Abbildung von Kanten, insbesondere wenn die Spitze einen großen Öffnungswinkel aufweist.

Bei optimaler Regelung und einer sehr scharfen Messspitze wird die Topografie der Oberfläche fast exakt abgebildet (**Abbildung 4 a**). Das Ende der Spitze kann als Kugel angenähert werden. Typische Spitzenradien liegen in einem Bereich von 5 bis 15 nm, die Spitze öffnet sich hinter dieser Kugel als Pyramidenstumpf. Das bedeutet, dass kleinere Strukturen in der Probenoberfläche, insbesondere Vertiefungen, nicht vollständig abgebildet werden können. Der Öffnungswinkel der Spitze bedingt, dass scharfe Kanten in der Topografie nicht als solche dargestellt werden können (**Abbildung 4 b**). Der Durchmesser einer abzubildenden Kugel erscheint größer, eine Kante erscheint als schiefe Ebene. Die Trägheit des Regelkreises macht sich insbesondere an Kanten in der Topografie bemerkbar: die Änderung in der Steigung der Topografie wird mit einer

zeitlichen Verzögerung registriert. Dadurch erscheinen Kanten abgeflacht und ein Regelfehler wird sichtbar. Dieses Verhalten kann man sich gezielt zu Nutze machen, um Änderungen in der Topografie abzubilden. Dazu wird bewusst in Kauf genommen, dass der Regelkreis träge arbeitet und eine Abbildung des Regelfehlers erstellt, die dann insbesondere Änderungen der Topografie verdeutlicht (vgl. **Abbildung 24** b und d, sowie **Abbildung 25**).

2.4. Dynamische Rasterkraftmikroskopie

Neben der Regelung auf die Größe der Kraft gibt es noch weitere Möglichkeiten, den Regelkreis zu schließen. Der Biegebalken kann zu einer (resonanten) Schwingung angeregt und die Amplitude oder die Frequenz dieser Schwingung als Regelgröße verwendet werden.

Im Folgenden soll mit einem einfachen Modell der Zusammenhang zwischen experimentell beobachtbaren Größen und der Kraft zwischen Spitze und Probe untersucht werden. Die freie Schwingung des Biegebalkens (inklusive der Spitze) kann näherungsweise als die eines harmonischen Oszillators angenommen werden. Es gilt das Hookesche Gesetz und die Proportionalität von Beschleunigung und Kraft:

$$\begin{aligned} -k \cdot z &= m \cdot \ddot{z} \\ \Leftrightarrow 0 &= \ddot{z} + \frac{k}{m} \cdot z \\ \Rightarrow 0 &= \ddot{z} + \omega_0^2 \cdot z \end{aligned} \tag{3}$$

Hier ist $-kz$ die wirkende Feder-Kraft, k die Federkonstante, z die Auslenkung des Biegebalkens, m die schwingende Masse und ω_0^2 die Substitution von k/m . Die Lösung der Differentialgleichung ist eine harmonische Schwingung:

$$z(t) = A \cdot \sin(\omega_0 \cdot t + \varphi) \tag{4}$$

Die Bedeutung von A ist die Amplitude (maximale Auslenkung) der Schwingung, φ eine Phasenverschiebung. Die Schwingungsfrequenz f kann aus der Eigenkreisfrequenz ω_0 direkt erhalten werden:

$$f = \omega_0 / 2\pi \quad (5)$$

Die Schwingung des Biegebalkens kann also durch drei wesentliche Größen beschrieben werden: die Amplitude A , die Phasenverschiebung φ und die Resonanzfrequenz f . Im Experiment wird der Biegebalken zu einer erzwungenen Schwingung mit der Kreisfrequenz Ω angeregt. Dazu wirkt eine äußere Kraft:

$$F = F_0 \cdot \cos(\Omega t) \quad (6)$$

Nähert sich die Spitze der Probenoberfläche an, so erfährt sie außerdem Wechselwirkungen mit verschiedenen Kräften F_{SP} (siehe 2.2, „SP“=Spitze-Probe). Diese Kräfte sind nicht konstant in Bezug auf den Abstand zur Oberfläche (siehe [Tabelle 1](#)), sondern variieren nicht-linear mit z . Das umgebende Medium übt zudem eine dämpfende Kraft α aus, die als proportional zur Geschwindigkeit angenommen wird.

Die Schwingung wird nun beschrieben als von einer äußeren Kraft getriebener, gedämpfter harmonischer Oszillator:

$$\ddot{z} + \Omega_0^2 \cdot z + \alpha \cdot \dot{z} = F_0 \cdot \cos(\Omega t) + F_{SP} \quad (7)$$

Somit erhält man für die Amplitude A und die Phase φ der Schwingung mit der Kreisfrequenz Ω die Resultate des getriebenen harmonischen Oszillators mit einer effektiven Federkonstante k_{eff} und einem Reibungskoeffizienten α_{eff}

Nach einiger Rechnung (nachzulesen in [43]) kann man für die Amplitude und die Phasenverschiebung zwischen Schwingung des Biegebalkens und äußerer Kraft folgende Ausdrücke erhalten:

$$A(\Omega) = \frac{F_0/m}{\sqrt{(\Omega^2 - \Omega_0^2)^2 + \left(\frac{\Omega \cdot \Omega_0}{Q}\right)^2}} \quad (8)$$

$$\varphi(\Omega) = \tan^{-1} \left(\frac{\frac{\Omega \cdot \Omega_0}{Q}}{\Omega^2 - \Omega_0^2} \right) \quad (9)$$

Hier ist Q der „Qualitätsfaktor“ der Schwingung. Die Resonanzfrequenz und der Qualitätsfaktor sind abhängig von den „effektiven“ Größen:

$$\Omega_0^2 = k_{eff}/m \quad (10)$$

$$Q = \frac{\Omega_0}{\alpha_{eff}/m} \quad (11)$$

Im Näherung kann man zeigen, dass F_{SP} durch eine effektive Federkonstante $k_{eff}=k+k_{SP}$ und eine Dämpfung $\alpha_{eff}=\alpha+\alpha_{SP}$ beschrieben wird. k_{SP} und α_{SP} beschreiben die Wirkung der Kraft zwischen Spitze und Probe. Dadurch ändern sich die messbaren Größen Eigenfrequenz und Phase der Schwingung. Dieses Verhalten ist in **Abbildung 5** verdeutlicht: die Amplitude der Schwingung verringert sich, wenn weiterhin mit einer konstanten, ursprünglichen Anregungsfrequenz der Biegebalken zu einer Schwingung angeregt wird. Im weit von der Oberfläche entfernten Fall würde diese Frequenz der freien Resonanzfrequenz entsprechen. Es ändert sich auch die Phasenverschiebung durch das Einwirken der unterschiedlichen Kräfte: attraktive Kräfte bewegen die Phasenverschiebung zu größeren Werten, repulsive Kräfte zu kleineren Werten. Hier zeigt sich bereits eine einfache Möglichkeit unterschiedliche Kräfte bei einer Messung voneinander zu unterscheiden: an der Phasenverschiebung.

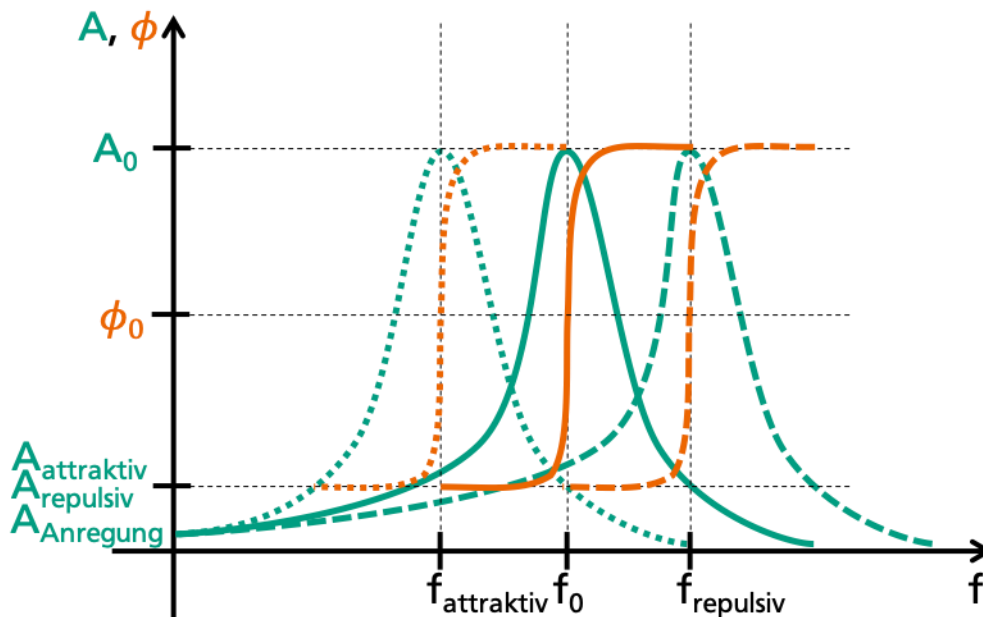


Abbildung 5 Verlauf der Amplitude A und Phasenverschiebung ϕ in Abhängigkeit der Frequenz. Die durchgezogenen Linien beschreiben den Verlauf der Amplitude und der Phase für den kraftfreien Fall, die gestrichelten Linien jeweils unter dem Einwirken attraktiver (kurze Striche) oder repulsiver (lange Striche) Kräfte. Die Resonanzfrequenz f_0 verschiebt sich zu kleineren Werten $f_{\text{attraktiv}}$, wenn attraktive Kräfte auf die Spitze einwirken und zu größeren Werten f_{repulsiv} , wenn repulsive Kräfte auf die Spitze einwirken. Wird der Biegebalken bei einer konstanten Frequenz (f_0) zum Schwingen mit der Amplitude A_0 angeregt, so vermindert sich seine Schwingungsamplitude, wenn attraktive oder repulsive Kräfte auf die Spitze einwirken auf $A_{\text{attraktiv}}$ oder A_{repulsiv} . Für sehr kleine Frequenzen vermindert sich die Amplitude im Grenzfall auf die Anregungsamplitude A_{Anregung} . Die Kurve für die Phasenverschiebung bewegt sich jeweils mit der Resonanzfrequenz, daraus resultiert eine Änderung der Phasenverschiebung bei Einwirkung von externen Kräften.

Die Amplitude einer Schwingung ist bei der Resonanzfrequenz des schwingenden Systems am größten und fällt nach beiden Seiten ab. Der Abfall ist umso größer, je dichter das umgebende Medium und damit die Reibung ist: während die Amplitude bei Messungen im Vakuum nahezu konstant bleibt, ist der Verlauf bei einer Messung in Wasser breiter als an Luft. Die Halbwertsbreite Δf dieser Funktion bestimmt den „Q-Faktor“ (oder die „Resonanzschärfe“) und beschreibt die Dämpfung des Systems nach:

$$Q = \frac{f_0}{\Delta f} \quad (12)$$

Bei der amplitudenmodulierten Regelung wird eine gedämpfte Amplitude als Sollwert für die Regelung verwendet, $A_{\text{soll}} < A_0$. Die Amplitude wird üblicherweise durch einen

Lock-in-Verstärker gemessen. Je nach wirkenden Kräften kann sich in diesem Fall die Phasenverschiebung zu größeren, oder zu kleineren Werten ändern. Bei der frequenzmodulierten Regelung wird eine Frequenzverschiebung in Bezug auf die Resonanzfrequenz als Sollwert für die Regelung verwendet, $f_{\text{soll}} < f_0$. Diese Regelgröße ist insbesondere dann von Vorteil, wenn der Q-Faktor sehr groß ist und damit die Änderung der Amplitude ebenfalls sehr groß ist. Die Messung der Frequenzverschiebung erfolgt oft mit einer Phasenregelschleife.

Die Regelung auf die Amplitude kann, bei hinreichend kleiner Amplitude der Schwingung des Biegebalkens, so erfolgen, dass die Messspitze nur attraktive Kräfte „erfährt“, sodass von einem attraktiven Modus gesprochen werden kann, oder aber, bei hinreichend großer Amplitude, in solcher Weise, dass die Messspitze sowohl attraktive, als auch repulsiver Kräfte „erfährt“ und von Intermittierenden Kontaktmodus gesprochen werden kann (siehe auch 2.2). Bei der Regelung auf die Frequenzverschiebung befindet sich die Messspitze entweder im attraktiven, oder im repulsiven Kraftbereich. Im attraktiven Kraftbereich spricht man hier auch vom „Nicht-Kontaktmodus“. Die Amplituden sind in diesem Fall kleiner, und ein Intermittierender Modus ist nicht möglich.

2.5. Quasistatische Rasterkraftmikroskopie

Neben der statischen und der dynamischen Rasterkraftmikroskopie ist auch eine Mischform möglich: Bei der quasistatischen Rasterkraftmikroskopie schwingt der Biegebalken ähnlich wie beim Intermittierenden Modus, aber mit einer Frequenz deutlich unterhalb der Resonanzfrequenz, $f_{\text{qs}} \ll f_0$. Ein klassischer Regelkreis ist nicht notwendig, die Bewegung der Spitze auf die Probenoberfläche wird umgekehrt, sobald der Sollwert der Verbiegung des Biegebalkens erreicht ist.

Diese Methode funktioniert nicht zeilenweise, sondern es wird an jedem zu messenden Punkt der Probe die Spitze des Biegebalkens in Kontakt mit der Probenoberfläche gebracht und der Kontakt wieder gelöst und so die Probenoberfläche abgerastert. Während des gesamten Vorgangs wird die Verbiegung des Biegebalkens gemessen. Die Verbiegung δ kann als Funktion der z-Rastereinheitsposition Z aufgetragen werden. Aus δ erhält man dann mit dem Hookeschen Gesetz die Kraft F :

$$F = k_{Balken} \cdot \delta \quad (13)$$

Dabei ist F die Kraft mit der der Biegebalken die Spitze auf die Probenoberfläche drückt, k_{Balken} die Federkonstante des Biegebalkens und δ die Verbiegung des Biegebalkens in Metern. Das gemessene Signal $F(\delta)$ entspricht also einer Kraft-Abstands Kurve.

Da sich der Biegebalken während dieses Vorgangs verbiegt, ist die Position der Spitze nicht gleich der z-Piezoposition. Um die Spitzenposition h zu erhalten, muss die Verbiegung des Biegebalkens berücksichtigt werden:

$$h = Z - \delta \quad (14)$$

Im Folgenden soll der grundsätzliche Verlauf einer Kraft-Abstands Kurve erläutert und auf verschiedene Spezialfälle eingegangen werden. In **Abbildung 6** ist die auf die Probe durch die mit dem Biegebalken über die Spitze aufgebrachte Kraft F in Abhängigkeit von der Position der Spitze h aufgetragen.

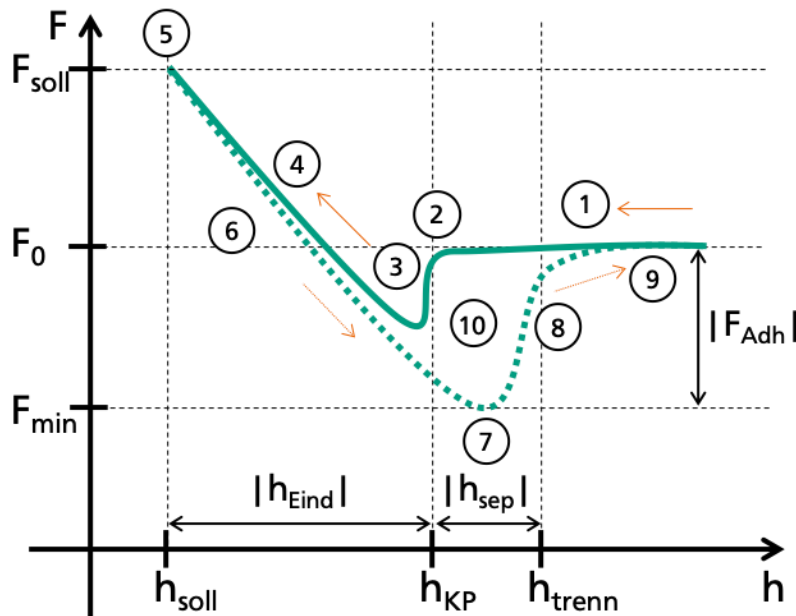


Abbildung 6 Schematischer Verlauf einer Kraft-Abstands Kurve. Die durchgezogene grüne Linie stellt die Hinfahrkurve dar, die gestrichelte grüne Linie die Rückfahrkurve. Die Variablen bedeuten: F_0 – Wert für die Kraft in der Ruhelage, F_{min} – niedrigster Wert für die Kraft bei maximaler Adhäsion, $|F_{Adh}|$ – Adhäsionskraft, Kraft die nötig ist, um Spitze und Probenoberfläche zu separieren, h_{soll} – Position der Spitze bei Erreichen des Kraftsollwerts, h_{KP} – Position der Spitze bei Erreichen des Kontaktpunkts (Definition des KP s.u. im Text), $|h_{sep}|$ – Distanz bis zur Separation von Spitze und Probenoberfläche, h_{trenn} – Position der Spitze bei Trennung von der Probenoberfläche, $|h_{Eind}|$ – maximale Eindringtiefe in die Probe. Die gestrichelten schwarzen Linien deuten die projizierten Positionen der entsprechenden Variablen auf den Achsen an. Die in Kreisen dargestellten Positionen 1 bis 10 deuten besondere Stellen im Verlauf der Kurve an und werden im Text genauer erläutert.

Eine Kraft-Abstands Kurve besteht aus einem Hinweg (durchgezogene Linie) und einem Rückweg (gestrichelte Linie). Verschiedene Bereiche können unterschieden werden, diese sind hier mit Zahlen 1 bis 9 gekennzeichnet. Zunächst nähert sich die Spitze frei von Wechselwirkungen der Probe an (1), die wirkende Kraft bleibt im Bereich dieser Grundlinie konstant. Abhängig von der Kalibrierung des Lichtzeigers, kann der experimentelle Wert der Kraft hier konstant von $F_0=0$ abweichen. In diesem Fall muss die Kurve korrigiert und auf 0 verschoben werden. An Punkt (2) erfährt die Spitze attraktive Wechselwirkungen durch die Oberfläche der Probe, dieser Punkt stellt den Kontaktpunkt zwischen Spitze und Oberfläche dar. Um den Kontaktpunkt zu bestimmen, gibt es unterschiedliche Definitionen: beispielsweise kann der letzte Punkt mit $F=0$ als Kontaktpunkt angenommen werden. Das Vorzeichen der Richtung der Veränderung der Kraft kehrt sich nun um (3) und die Spitze erfährt abstoßende Kräfte (4). An Punkt (5) ist der eingestellte Sollwert der Kraft und damit das Ende der Kraft-Abstands-Kurve erreicht. Die Bewegungsrichtung der Spitze kehrt sich um und die Kraft verringert sich (6) bis auf einen kleineren Wert (7), im Vergleich zu (3). Nun wirken wieder attraktive Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe (8), bis schließlich die Grundlinie erreicht wird (9). Ein solcher Verlauf ist typisch für weiche, biologische Proben, die mit einem weichen Biegebalken in flüssiger Umgebung gemessen werden. Der eingeschlossene Bereich zwischen der Kurve des Hinwegs und des Rückwegs (10) ist ein Maß für die Wirkung nicht-konservativer Kräfte, also auch für die im System dissipierte Energie. Der Betrag des Abstands der Kräfte in (1), der Kraft in der Ruhelage F_0 , und (7), der niedrigsten Kraft bei maximaler Adhäsion F_{\min} , ist ein Maß für die zwischen Spitze und Probenoberfläche wirkende Adhäsionskraft F_{Adh} , also die Kraft die aufgewendet werden muss, um Spitze und Probe voneinander zu separieren.

$$F_{Adh} = |F_0 - F_{\min}| \quad (15)$$

Aus dem Kontaktpunkt h_{KP} kann direkt die Topografie der Probenoberfläche abgeleitet werden. Bei Kenntnis des Kontaktpunkts kann die maximale Eindringtiefe h_{Eind} an der jeweiligen Stelle berechnet werden, sie ergibt sich aus dem Abstand des Kontaktpunkts h_{KP} zum Punkt beim Erreichen des Kraftsollwerts:

$$h_{Eind} = |h_{KP} - h_{soll}| \quad (16)$$

Die Länge, die zum vollständigen Separieren von Spitze und Probe notwendig ist, ergibt sich aus dem Abstand des Kontaktpunkts h_{KP} und dem Punkt, an dem sich Spitze und Probe trennen h_{trenn} .

$$h_{sep} = |h_{KP} - h_{trenn}| \quad (17)$$

Je nach Probentyp, Messumgebung, Biegebalken und Spitze treten verschiedene Spezialfälle der oben beschriebenen Kraft-Abstands Kurve auf. Die folgende **Abbildung 7** zeigt einige typische Verläufe.

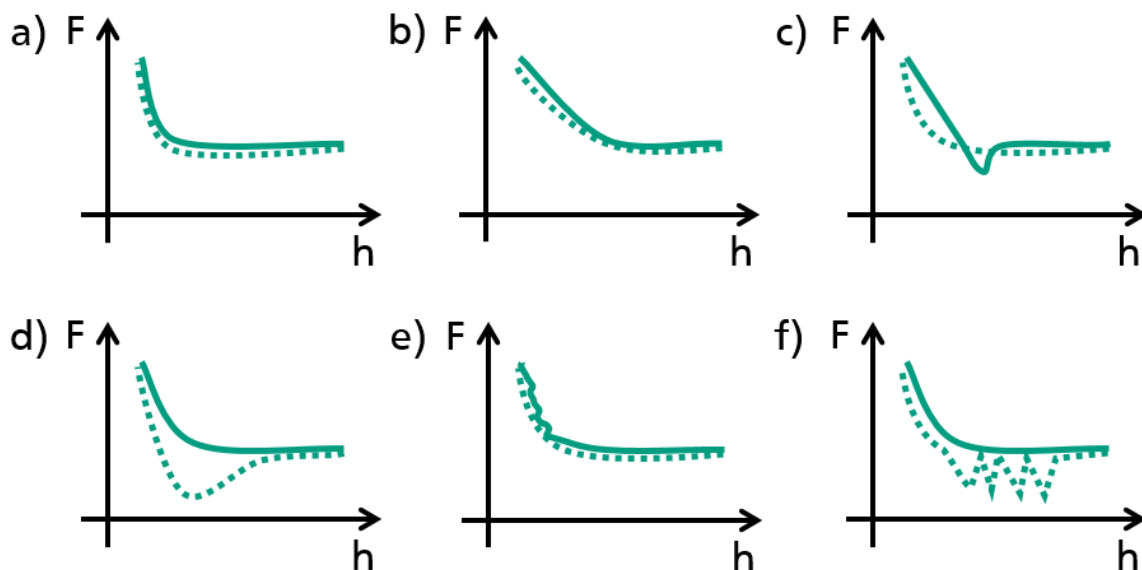


Abbildung 7 Schematische Darstellung verschiedener Kraft-Abstands Kurven unter unterschiedlichen Bedingungen. Es ist jeweils die Kraft F über die Position der Spitze des Biegebalkens h aufgetragen. Unterschiedliches Verhalten der Probe und insbesondere in der Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze wird in a-f dargestellt: a) – harte Probe, b) – weiche Probe, c) – mit „snap into contact“, d) – mit Adhäsion, e) – durch mehrere Schichten und f) – mit Molekülfaltung.

Auf harten Oberflächen (das heißt, durch die Spitze nicht verformbar), die im Vakuum, einer trockenen Atmosphäre oder in Flüssigkeit gemessen werden, tritt normalerweise

wenig bis keine Adhäsion und keine Dissipation auf, Hinweg und Rückweg liegen aufeinander a). Die Steigung des linearen Bereichs der Kurve, nach dem Kontakt ($h < h_{KP}$), ist ein Maß für die Federkonstante des Biegebalkens. Ist die zu messende Probe weich im Vergleich zur Federkonstante des Biegebalkens und somit durch die Spitze verformbar, so ist der lineare Bereich der Kraft-Abstands Kurve ein Maß für die mechanischen Eigenschaften der Probe b). Auf Oberflächen, die bei normalen Laborbedingungen vorliegen, kann eine Schicht Wasser aus der Luftfeuchtigkeit kondensieren. Beim Annähern der Spitze an die Oberfläche kann es zu einem plötzlichen Kontakt kommen c), wenn das kondensierte Wasser eine attraktive Wechselwirkung mit der Spitze eingeht (engl. „snap into contact“). Das ist auch möglich, wenn Spitze und Probenoberfläche eine chemische Bindung eingehen, was zum Beispiel dann der Fall ist, wenn die Spitze funktionalisiert wurde, um für bestimmte Moleküle sensitiv zu sein. In d) wirkt zwischen Spitze und Probe eine Adhäsionskraft F_{Adh} . Das kann wiederum durch einen Wassermeniskus oder eine chemische Wechselwirkung erfolgen. Elektrostatische Wechselwirkungen können ebenfalls eine Adhäsionskraft hervorrufen. Durchdringt die Spitze auf dem Hinweg mehrere horizontale Schichten der Probenoberfläche, so sind diese im Bereich der Abstoßenden Kräfte als unterschiedliche Steigungen sichtbar e). Der Verlauf der Kurve ist dann nicht mehr glatt und linear, was für die spätere Auswertung in Bezug auf die Darstellung von Strukturen unterhalb der Probenoberfläche von grundlegender Bedeutung ist. Sind Spitze und Probe durch ein langkettiges, gefaltetes Molekül verbunden worden, so kann das Entfalten des Moleküls in der Rückfahrkurve beobachtet werden f) [44]. Dabei können unter anderem die Länge des Moleküls und Bindungskräfte gemessen werden.

Werden Kraft-Abstands Kurven gerastert, an vielen Punkten in einem Probenausschnitt aufgenommen, so können die daraus erhaltenen physikalischen Größen orts aufgelöst dargestellt werden. Insbesondere ist eine mechanische Charakterisierung der Probe möglich. Dieses Verfahren wird in Kapitel 8 genauer ausgeführt und am experimentellen Beispiel diskutiert.

Die unter dem Namen „PeakForce-Tapping“ bekannte Abbildungsmethode funktioniert ähnlich, jedoch werden die Kraft-Abstands Kurven hier nicht dauerhaft gespeichert. Die Topografie der Probenoberfläche wird hier aus der Position beim Erreichen des Kraft-

sollwerts erhalten, der E-Modul, die Adhäsion und Deformation (der Probe) durch Anpassen einer Funktion (siehe auch 2.6) in Echtzeit bestimmt, Bilder generiert und die Messdaten danach direkt verworfen.

2.6. Mechanische Charakterisierung – Kontaktmechanik

Um mit einem Rasterkraftmikroskop die mechanischen Eigenschaften einer Probe quantifizieren zu können, muss ein mechanischer Kontakt zwischen Messspitze und Probe hergestellt werden. Ist die Geometrie der Kontaktfläche bekannt, kann ein Kontaktmodell angewendet werden, mit dem aus den gemessenen Werten für die Kraft der Elastizitätsmodul in diesem Messpunkt berechnet werden kann. Die Wahl des Kontaktmodells hängt sowohl von der Geometrie der Messspitze ab, wie auch von den elastischen Eigenschaften der Probe und den wirkenden Kräften zwischen Spitze und Probe.

Werden keine Adhäsionskräfte betrachtet und elastische Körper angenommen, kann das Modell von Heinrich Hertz verwendet werden, welches 1882 veröffentlicht wurde [45] und für das es Erweiterungen für verschiedene Geometrien gibt, die von Ian Sneddon 1964 abgeleitet wurden [46]. Es wird angenommen, dass sich die Kräfte zwischen Messspitze und Probe gleichmäßig über die Kontaktfläche verteilen.

In rasterkraftmikroskopischer Anwendung ist insbesondere die quadratische und die rechteckige Pyramide, sowie der Kegel als Modell für die Geometrie der Messspitze von besonderer Bedeutung, da kommerzielle Messspitzen meistens diese äußere Form haben. Für eine vierseitige Pyramide gilt in diesem Fall folgender Zusammenhang zwischen gemessener Kraft F , Messspitzenposition h und Elastizitätsmodul E :

$$F = \frac{E}{1 - \nu^2} \cdot \frac{\tan \alpha}{\sqrt{2}} \cdot h^2 \quad (18)$$

Der Öffnungswinkel der Messspitze ist hier α , die Poissonzahl (Querkontraktionszahl des Probenmaterials) ν . Es gilt hier die Annahme, dass $E_{\text{Messspitze}} \gg E_{\text{Probe}}$ ist und somit die Messspitze bei Indentation nicht verformt wird.

Allerdings kann eine Probe nicht nur durch Druck (wie im Hertz Modell angenommen), also repulsive Kräfte verformt werden, sondern auch durch attraktive Wechselwirkun-

gen. Diese vergrößern die Kontaktfläche. Das erste Kontaktmodell, in dem diese Wechselwirkungen berücksichtigt werden ist das „JKR-Modell“, das von Johnson, Kendall und Roberts 1971 entwickelt wurde [47].

$$F = \frac{4}{3} \cdot \frac{a^3}{R} \cdot \frac{E}{1 - \nu^2} - 2 \cdot \sqrt{2\pi a^3 \omega \cdot \frac{E}{1 - \nu^2}} \quad (19)$$

Hier ist a der Radius des Kontaktbereiches (der insbesondere abhängig von h ist), R der Endradius der Messspitze und ω die Adhäsionsenergie. Hier wird bedacht, dass sich durch attraktive Wechselwirkungen ein „Hals“ zwischen Probenoberfläche und Messspitze bilden kann. Das ist sowohl bei Annäherung an die Probenoberfläche möglich, wie auch beim Verlassen des Kontaktbereiches. Eine direkte Lösung dieser Gleichung nach $E(h)$ ist wegen der Abhängigkeit von a von h nicht möglich. Oft wird die „JKR-zwei-Punktmethode“ [48] zur Lösung verwendet.

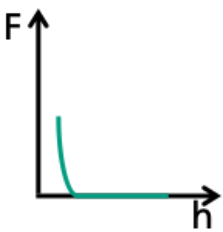
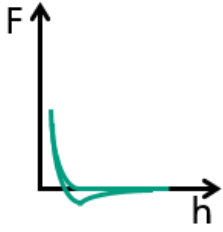
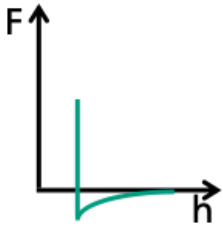
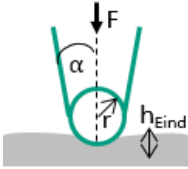

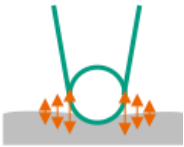
Neben den kurzreichweitigen Kräften, die in der Kontaktfläche auftreten, können auch noch Wechselwirkungen um den Kontaktbereich herum beitragen, die eine etwas größere Reichweite besitzen. Das wird im „DMT-Modell“ bedacht, indem ein Ring um den Kontaktbereich eingeführt wird. Dieses Modell wurde von Derjaguin, Muller und Toporov 1975 vorgestellt [49, 50]

Es konnte durch Tabor 1977 gezeigt werden, dass das JKR- und das DMT-Modell Grenzfälle einer gemeinsamen Theorie sind und durch den heute als „Tabor-Parameter“ bekannten Term verknüpft werden können [51]. Daraus konnte das „Maugis-Dugdale-Modell“ entwickelt werden [52].

Es ist möglich, dass die Messspitze einen dauerhaften Eindruck in der Probe hinterlässt, beispielsweise durch plastische Verformung. Die Geometrie dieses Eindrucks ist abhängig von der Geometrie der Messspitze. Das Kontaktmodell von Oliver und Pharr [53] berücksichtigt eine solche dauerhafte Verformung und wird insbesondere bei der Nanoindentierung eingesetzt [54]. Aus der gemessenen Kurve der Entlastung werden in diesem Fall mechanische Größen der Probe abgeleitet. Der Durchmesser der Messsonde ist hier um den Faktor 10 bis 100 größer, als bei rasterkraftmikroskopischen Spitzen [55].

In der folgenden Tabelle werden die Kontaktmodelle zusammengefasst, die in dieser Arbeit die größte Bedeutung haben. Wichtige Unterschiede sind dargestellt, insbesondere das Verhalten in Bezug auf den Verlauf einer Kraft-Abstands Kurve und die Anwendbarkeit auf verschiedene Materialien ist in dieser Arbeit von Bedeutung.

Tabelle 2 Kontaktmodelle, deren Verlauf einer Kraft-Abstands Kurve, Wechselwirkungen im Kontaktbereich und Anforderungen an die Gegebenheiten der Messung

Modell	Hertz / Sneddon	JKR	DMT
Verlauf der Kraft-Abstands Kurve			
Kontaktbereich			
Adhäsion	Keine Adhäsion	Adhäsion in Kontaktfläche Große Adhäsion	Adhäsion um Kontaktfläche Kleine Adhäsion
Probe	Allgemein	Weiche Proben	Harte Proben
Spitze	Häufige Anwendung: sphärische Messsonde	Großer Spitzenradius	Kleiner Spitzenradius

Die verschiedenen Kontaktmodelle haben je nach Beschaffenheit der Probe und der Messsonde unterschiedliche Einsatzbereiche [56]. In dieser Arbeit findet meistens das Hertz-Modell in der Erweiterung für eine quadratische, pyramidale Spitze (Sneddon) Anwendung, das sich besonders für weiche Probe mit geringer Adhäsion eignet.

3. Darstellung von Strukturen unterhalb der Oberfläche

Die Rasterkraftmikroskopie ist grundsätzlich eine Methode, mit der die Oberfläche von Proben abgebildet werden kann. Jedoch ist es unter bestimmten Bedingungen möglich auch Strukturen unterhalb der Oberfläche darzustellen. Dazu sind zum einen spezielle Betriebsmodi notwendig, die aus Erweiterungen der in Kapitel 2 vorgestellten Modi bestehen. Zum anderen müssen an die zu untersuchenden Proben einige Anforderungen gestellt werden. Zwei Möglichkeiten, Strukturen unterhalb der Oberfläche sichtbar machen zu können, werden im Folgenden vorgestellt und im Vergleich zueinander diskutiert.

3.1. Oberflächennahe Volumenabbildung mit multimodaler Anregung

Die Spitze des Biegebalkens in der Rasterkraftmikroskopie erfährt im Allgemeinen Kräfte, die von der Oberfläche einer zu messenden Probe ausgehen. Das hat zur Folge, dass die in erster Näherung dargestellten Strukturen ein Produkt der Probenoberfläche sind. Allerdings können die Reichweiten verschiedener, von der Oberfläche ausgehender Kräfte sehr unterschiedlich sein (siehe 2.2). Im Folgenden wird gezeigt, wie man mittels Rasterkraftmikroskopie Kräfte unterschiedlicher Reichweite voneinander unterscheiden kann. Sind verschiedene Bedingungen erfüllt, lässt sich diese Technik nutzen, um Strukturen sichtbar zu machen, die sich unterhalb einer Oberfläche befinden.

Bei multimodaler Rasterkraftmikroskopie wird der Biegebalken zu einer Schwingung mit mehr als nur einer Frequenz angeregt [57]. Grundsätzlich gibt es mehrere Grundschwingungsfrequenzen für einen solchen Biegebalken, je nach dem, in welcher Richtung die Schwingung stattfinden soll [58]. Man kann zwischen der „normalen“ vertikalen Schwingung auch eine Biegeschwingung (in der Horizontalen) und einer Torsion unterscheiden. Jede Bewegungsrichtung hat mehrere Eigenfrequenzen, die bei externer Anregung zur Resonanz gebracht werden können. Diese Eigenfrequenzen sind meist keine ganzzahligen Vielfache der Grundschwingungsfrequenz, also höhere harmonische Eigenschwingungen. Man kann das Frequenzspektrum eines Biegebalkens durch das thermische Rauschen ermitteln. Dabei regen Moleküle aus der Umgebung den Biegebalken durch Stöße zu Schwingungen an. Die Schwingungsamplitude des Biegebalkens ist in diesem Fall sehr klein, wenige Ångström. Durch Fouriertransformation des

„Rausch-Signals“ entsteht das Leistungsdichtespektrum und die auftretenden Eigenschwingungen können abgelesen werden. In **Abbildung 8** sind die in einem rechteckigen Biegebalken gemessenen, auftretenden vertikalen Schwingungsfrequenzen aufgetragen. Bei Raumtemperatur und an Luft beträgt die Frequenz der Grundschiwingung $f_{01}=80$ kHz für diesen Biegebalken.

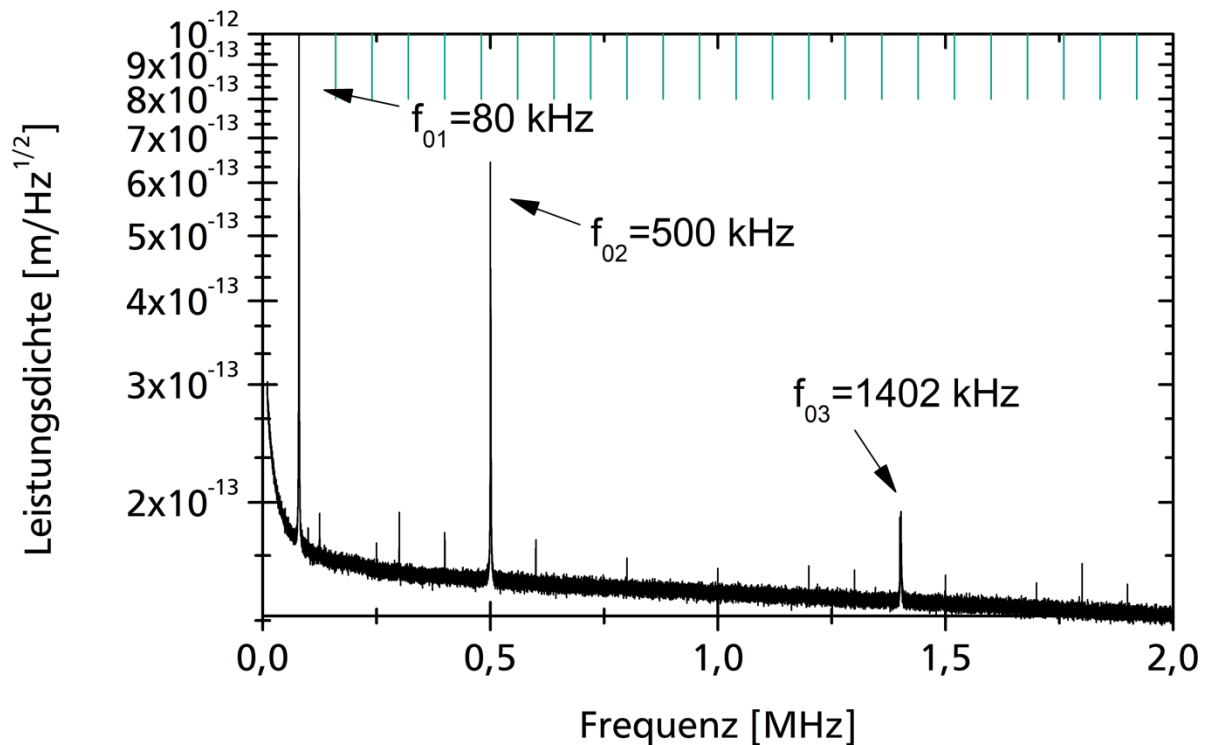


Abbildung 8 Leistungsdichtespektrum eines rechteckigen Biegebalkens. Auftretende vertikale („normale“) Schwingungsfrequenzen eines rechteckigen Biegebalkens unter thermischem Rauschen. Messung bei Raumtemperatur und an Luft. Biegebalken Bruker MESP-HM-V2, Herstellerangaben: $f_{01}=75$ kHz, $k=3,0$ N/m.

Die zweite Eigenfrequenz liegt bei $f_{02}=500$ kHz, die dritte bei $f_{03}=1402$ kHz. Das entspricht dem 6,3-fachen beziehungsweise dem 17,6-fachen der Grundschiwingungsfrequenz. Die grünen, vertikalen Geraden bezeichnen die Lage der harmonischen Schwingungen und sind, bezogen auf die Grundschiwingungsfrequenz, ganzzahlige Vielfache. Die Lage der Eigenfrequenzen ist je nach Geometrie des Biegebalkens sehr unterschiedlich. Einige Beispiele sind in Tabelle 3 deutlich gemacht.

Tabelle 3 Höhere Eigenfrequenzen der vertikalen Schwingung für verschiedene Biegesysteme.

	f_{02}	f_{03}	f_{04}
Schwingende Saite	$= 2 \cdot f_{01}$	$= 3 \cdot f_{01}$	$= 4 \cdot f_{01}$
Rechteckiger Biegebalken [59]	$= 6,3 \cdot f_{01}$	$= 17,6 \cdot f_{01}$	$= 34,4 \cdot f_{01}$
Dreieckiger Biegebalken mit zwei Stegen [60]	$= 3,9 \cdot f_{01}$	$= 5,6 \cdot f_{01}$	$= 12,2 \cdot f_{01}$

Diese höheren Resonanzfrequenzen können in der multimodalen Rasterkraftmikroskopie gezielt ausgenutzt werden. Die vergleichsweise kleinen Amplituden der höheren Eigenfrequenzen ermöglichen es, nichtlineare Abhängigkeiten der Kräfte in direkter Nähe zur Probenoberfläche auszuschließen [61]. Die Amplituden der höheren Eigenfrequenzen werden meist so klein gehalten, dass auf dieser Skala die nichtlineare Kraft annäherungsweise linear erscheint. Die höheren Frequenzen können ebenso benutzt werden um langreichweitige Kräfte zu messen, während gleichzeitig die kleinere Grundfrequenz genutzt wird, um die Topografie der Probe zu detektieren, also sensitiv für kurzreichweitige, abstoßende Kräfte zu sein. Diese beiden Schwingungen werden als überlagertes Anregungssignal auf den Biegebalken gegeben, wobei eine für „bimodale Schwingungen“ typische Schwingungskurve entsteht. Diese ist in **Abbildung 9** gezeigt.

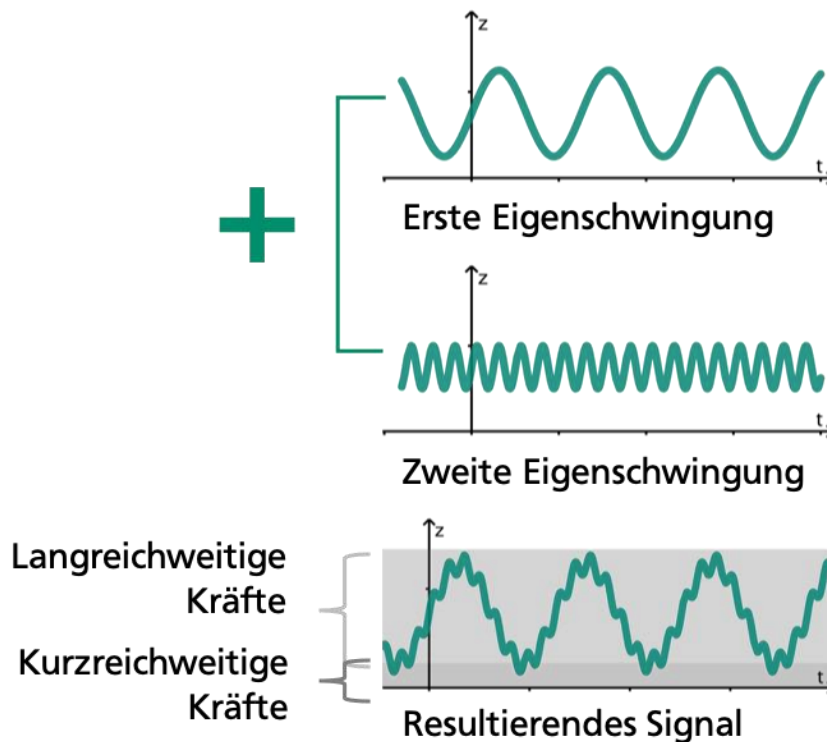


Abbildung 9 Bimodale Rasterkraftmikroskopie: die Überlagerung der ersten und der zweiten Eigenfrequenz des Biegebalkens bei der Anregung führt zu einem typischen, resultierenden Signal. Die unterschiedlichen „Aufenthaltsdauern“ der beiden Schwingungen in der Nähe der Probenoberfläche führen zu unterschiedlichen Sensitivitäten in Bezug auf lang- und kurzreichweitige Kräfte: die erste Eigenschwingung ist insbesondere für kurzreichweitige Kräfte sensitiv, die zweite Eigenschwingung insbesondere für langreichweitige Kräfte, wie magnetische Wechselwirkungen.

Von Bedeutung sind auch die Amplituden der beiden Schwingungen, die vom Benutzer eingestellt werden können: die kleinere Frequenz hat eine um ein Vielfaches größere Amplitude, als die schnellere, überlagerte Schwingung. Während einer Schwingungsperiode der Grundschiwingung vollführt die überlagerte Schwingung eine große Anzahl von Perioden. Aufgrund ihrer kleineren Amplitude ist sie dabei die meiste Zeit im Bereich langreichweitiger Kräfte, die kurzreichweitigen Kräfte tragen so gut wie nicht zu einer Störung der Schwingung bei [62]. Gleichzeitig ist diese Schwingung frei von Einschränkungen durch den Regelkreis. Das sind die wesentlichen Gründe, die es ermöglichen bei einer Messung gleichzeitig unterschiedliche Kräfte voneinander unterscheiden zu können und somit mehr Informationen zu erhalten, als das reine, monomodale Phasensignal erlaubt (vgl. Kapitel 2.4). In Kapitel 4 werden Beispiele gezeigt, die dieses Verhalten ausnutzen.

Die multimodale Anregung ermöglicht es insbesondere auch, Strukturen unterhalb einer Probenoberfläche sichtbar zu machen. Dazu ist eine Voraussetzung notwendig: die

unter der Oberfläche liegenden Strukturen müssen langreichweitige Kräfte ausprägen können, deren messbare Wechselwirkungslänge größer ist, als die Dicke der darüber liegenden Grenzfläche. Ein alltägliches Beispiel für ein solches System ist die Festplatte eines Computers. Die Dateninformationen werden hier als Richtung der Magnetisierung in einer magnetisierbaren Schicht gespeichert. Diese Schicht wird auf eine Trägerschicht (häufig Glas) aufgebracht und von einer Schutzschicht (häufig ein Polymer) bedeckt [63]. Die „magnetische Information“ ist folglich nicht direkt auf der Oberfläche zugänglich, sondern liegt unter der Oberfläche verborgen und kann mit der oben beschriebenen Methode aufgeklärt werden (siehe auch Kapitel 4). Ähnlich verhält es sich mit dem körpereigenen Protein Ferritin. In einer Proteinhülle eingeschlossen befindet sich ein superparamagnetischer Kern, bestehend aus einem Gemisch aus insbesondere Ferrihydrit und Hematit [64]. Mit der hier vorgestellten Methode lassen sich im selben Experiment sowohl die Struktur der Proteinhülle, wie auch die des Kerns darstellen (siehe auch Kapitel 5). Das Potenzial dieser Methode wird an Beispielen in Kapitel 4 und Kapitel 5 deutlich gemacht.

3.2. Volumenabbildung durch Kartierung von Kraft-Abstands Kurven

Die in Kapitel 2.5 vorgestellte Methode, Kraft-Abstands Kurven als Abbildungsmodus zu verwenden, ermöglicht es auch unter der Probenoberfläche befindliche Strukturen sichtbar zu machen. In Kombination mit einer geeigneten Kontaktmechanik (siehe auch Kapitel 2.6) ist das relativ direkt möglich: sind unter einer mechanisch weichen Oberflächenschicht mechanisch harte Strukturen verborgen, so lassen sich aus einer Messung des Kontaktpunkts die Oberflächentopografie ableiten und über die Kontaktmechanik werden die unter der Oberfläche liegenden, mechanisch harten Strukturen sichtbar gemacht. Für die Interpretation solcher Daten ist es jedoch notwendig, bereits einige Vorkenntnisse des Aufbaus der Probe zu haben. Eine Bestimmung der Tiefenlage der Strukturen ist so nicht möglich.

Eine dreidimensionale, mechanische Charakterisierung der Probe ist jedoch möglich, wenn die Auswertung der Kraft-Abstands Kurven nicht, wie bei der Kontaktmechanik üblich, im Gesamten, beginnend mit dem Kontaktpunkt bis zum Erreichen des Kraftsollwerts erfolgt, sondern abschnittsweise, beginnend mit dem Kontaktpunkt. So entsteht eine punktweise, dreidimensionale Kartierung der Probe.

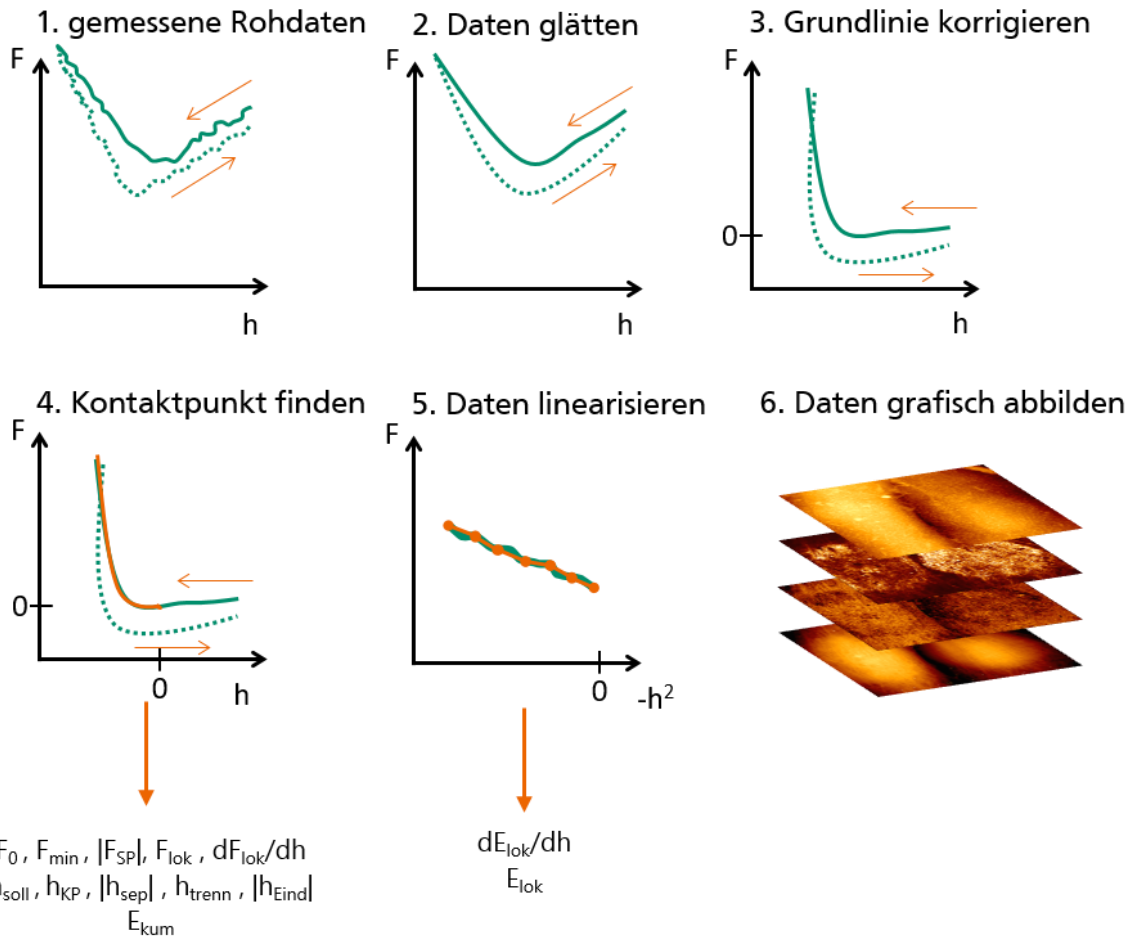


Abbildung 10 Die lokale Auswertung von Kraft-Abstands Kurven durch stückweise lineare Interpolation ermöglicht es eine Probe auch unterhalb der Oberfläche mechanisch zu charakterisieren. Das Schrittweise Vorgehen, um diese Daten zu erhalten, ist hier schematisch dargestellt. Zusätzlich zu den in erläuterten Größen können mit dieser Methode auch lokale Größen ausgewertet werden, wie dE_{lok}/dh die lokale Änderung des Elastizitätsmoduls und E_{lok} der absolute, lokale Wert des Elastizitätsmoduls.

Dazu werden die Daten in mehreren Schritten vorbereitet und ausgewertet. Die verschiedenen Arbeitsschritte sind in **Abbildung 10** symbolisiert. Zunächst werden die gemessenen Rohdaten (1) entrauscht und geglättet. Dazu kommt ein Savitzky-Golay Filter [65] zur Anwendung (2). Die Grundlinie des kräftefreien Bereichs wird über einen für die jeweilige Messung fest gewählten Höhenabschnitt definiert, als lineare Funktion angepasst und die Messdaten damit so korrigiert, dass die angepasste Funktion ohne Steigung, konstant auf Null verläuft (3). Dadurch verschiebt und dreht sich die gemessene Kurve. Um den Kontaktpunkt zwischen Messspitze und Probenoberfläche zu finden gibt es verschiedene Methoden:

- ein Punkt der außerhalb eines Konfidenzintervalls liegt (wie beispielsweise der Standardabweichung der Basislinie),

- ein Punkt mit einem gewissen Mindestabstand gegenüber dem davorliegenden Punkt,
- der letzte Punkt der kleiner oder gleich Null ist (4), also der Beginn des repulsiven Bereichs (wie hier in dieser Arbeit verwendet).

Schon aus dem damit vorliegenden Bearbeitungszustand der Messdaten kann eine Reihe von Größen erhalten werden, wie zum Beispiel die lokale Kraft auf die Spitze F_{lok} , die Änderung dieser Kraft dF_{lok}/dh (die effektive Kontaktsteifigkeit), die Position des Kontaktpunkts h_{kp} , und damit ein Maß für die Topografie der Probenoberfläche, die maximale Eindringtiefe in die Probe h_{Eind} , ein einfaches Maß für mechanische Eigenschaften. Mit Hilfe eines Kontaktmodells kann in diesem Zustand auch der Elastizitätsmodul unterhalb des Kontaktpunkts der Kraft-Abstands Kurve berechnet werden.

Im letzten Bearbeitungsschritt (5) werden die Daten linearisiert aufgetragen. Je nach verwendeter Kombination aus Kontaktmodell und Spitzengeometrie werden die Daten über einen spezifischen Exponenten der Spitzenposition aufgetragen (siehe auch Kapitel 2.5). Im Fall einer vierseitigen, quadratischen Pyramide als Spitze und Verwendung Herzscher Kontaktmechanik (Gleichung (18)), muss über $-h^2$ aufgetragen werden, um die Daten zu linearisieren. Eine stückweise lineare Interpolation dieser Auftragung ergibt für die Steigung jedes Stücks einen Wert für den effektiven Elastizitätsmodul. Dieser ist lokal und damit abhängig von der Tiefenlage: $E_{lok}(h)$. Natürlich kann auch die Änderung des Moduls mit der Tiefe ausgewertet werden: dE_{lok}/dh .

Damit dieses Auswerteverfahren überhaupt angewendet werden kann, muss die zu messende Probe so beschaffen sein, dass die Messspitze die tieferliegenden Strukturen erfassen kann. Das kann auf zwei Wegen erfolgen, die in **Abbildung 11** als Grenzfälle dargestellt sind.

Eine Möglichkeit ist, dass die Messspitze sich durch die Probe hindurchbewegt (**Abbildung 11 a**). Die Strukturen, die im Weg der Spitze liegen werden, zum Beispiel durch den Druck, den die Spitze ausübt, durchlässig. In diesem Fall ist es möglich, dass die Werte des Elastizitätsmoduls nicht monoton steigen: eine Wegabhängigkeit ist aufgrund der Durchlässigkeit der Strukturen aufgehoben. Ebenso ist es möglich, dass die Messspitze die Probe verformt (**Abbildung 11 b**). Dabei werden insbesondere Änderungen des Elastizitätsmoduls dE_{lok}/dh registriert, die absoluten Werte sind abhängig von den jeweils vorherigen Werten, was auch bedeutet, dass der Elastizitätsmodul $E_{lok}(h)$ mit zunehmender Tiefe monoton zunimmt.

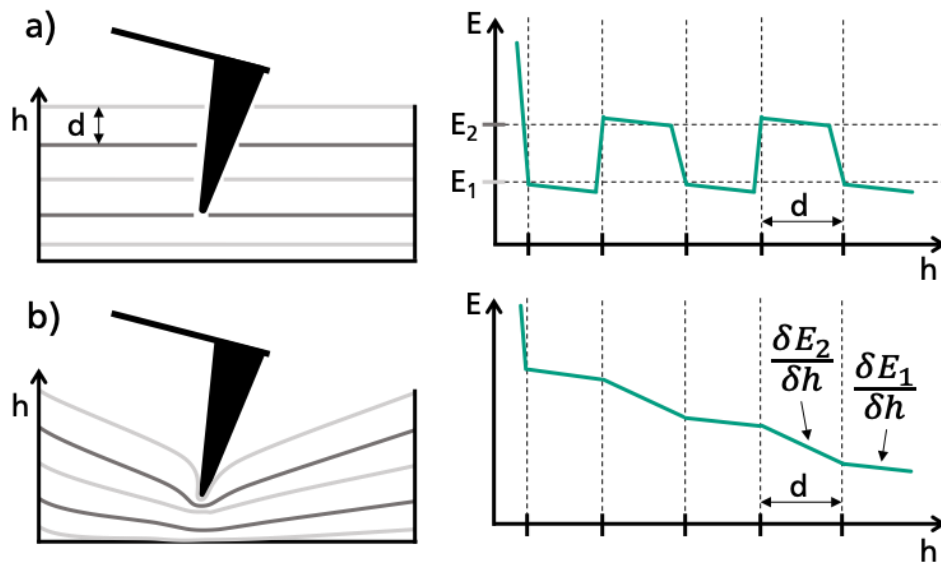


Abbildung 11 Eine Messspitze durchdringt (a) oder drückt (b) auf eine Probe, die aus zwei wechselnden Schichten mit unterschiedlichem Elastizitätsmodul besteht. Der jeweilige Verlauf des Elastizitätsmoduls E ist neben der Teilabbildung dargestellt. Die beiden Varianten stellen Grenzfälle der Möglichkeiten dar, mit denen eine Messspitze und ein Material wechselwirken können.

Die so erhaltenen Messdaten können in einer dreidimensionalen Abbildung dargestellt werden. So ist es möglich, mehrere Messgrößen gleichzeitig sichtbar zu machen, beispielsweise: im Volumen der Abbildung den lokalen Elastizitätsmodul $E_{lok}(h)$, als Topografie die Höhen-Position des Kontaktpunktes und als Farbcodierung auf der Oberfläche die maximale Eindringtiefe in dem jeweiligen Punkt (siehe Kapitel 8).

3.3. Vergleich der Methoden für Volumenabbildung

Beide hier vorgestellten Methoden, die Multimodale Rasterkraftmikroskopie und die lokale Auswertung von Kraft-Abstand Kurven, ermöglichen es, Strukturen sichtbar zu machen, die unter einer Oberfläche verborgen liegen.

Die Voraussetzungen, die notwendig für die Anwendung der einen oder der anderen Methode sind, sind jedoch unterschiedlich: für die Multimodale Rasterkraftmikroskopie müssen die zu detektierenden Strukturen mit langreichweitigen Kräften verknüpft werden. Zum Beispiel könnte eine solche Struktur mit einem magnetischen Feld verknüpft sein, um sichtbar gemacht werden zu können. Die Methode über das Auswerten von Kraft-Abstands Kurven benötigt Proben, die entweder so weich sind, dass sie durch die

Messspitze deformiert werden können, oder die Strukturen besitzen, die so beweglich sind, dass die Messspitze sie durchdringen kann.

Deutliche Unterschiede zeigen die beiden Methoden in Bezug auf die Messgeschwindigkeit. Die Aufnahme von Kraft-Abstands Kurven dauert um ein Vielfaches länger, als die „klassische“ Rasterkraftmikroskopie. An jedem Punkt der Aufnahme muss im Fall von Kraft-Abstands Kurven eine Bewegung in z-Richtung erfolgen, die groß genug ist, den Kontaktbereich der Probe zu erreichen, wieder vollständig zu verlassen und den nächsten Messpunkt zu erreichen ohne in Kontakt zu treten, auch wenn die Topografie der Probe eine große Rauheit aufweist. Typische experimentelle Parameter sind **Tabelle 4** zu entnehmen:

Tabelle 4 Vergleich typischer experimenteller Parameter multimodaler und Kraft-Abstandskurvenbasierter Rasterkraftmikroskopie

	Multimodale Rasterkraftmikroskopie	Kraft-Abstands Kurven basierte Rasterkraftmikroskopie
Probe	Block-Copolymer	Lebende menschliche Zelle
Gemessene Fläche / Volumen	$1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$	$30\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$
Datenpunkte	256×256	$512 \times 512 \times 640$
Messgeschwindigkeit	$v_x = 2\ \mu\text{m/s}$	$v_x = 2\ \mu\text{m/s}$, $v_z = 100\ \mu\text{m/s}$
Dauer pro Zeile	1 s	20,5 s
Auflösung	$A_{x,y} = 4\ \text{nm/Pixel}$	$A_{x,y} = 59\ \text{nm/Pixel}$ $A_z = 3\ \text{nm/Pixel}$
Dauer der Messung	$\approx 4\ \text{min}$	$\approx 180\ \text{min}$
Datenmenge	$\approx 1\ \text{MB}$	$\approx 640\ \text{MB}^1$

Während eine typische Messung mit multimodaler Rasterkraftmikroskopie wenige Minuten dauert, müssen für Kraft-Abstandskurven basierte Messungen mehrere Stunden

¹ Die tatsächliche Größe der Messdatei ist häufig wesentlich (Faktor 5 bis 10) größer, da häufig zu jeder einzelnen Kurve Metadaten abgespeichert werden und mehrere Datenkanäle gleichzeitig aufgezeichnet werden.

veranschlagt werden. Auch die zu verarbeitenden Mengen an Rohdaten unterscheiden sich um eine Größenordnung.

Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden Methoden ist, dass während der Aufnahme einer Kraft-Abstands Kurve keine laterale Bewegung der Messspitze stattfindet. Kräfte die durch die Messspitze in der Probenebene eingebracht werden, sind dementsprechend wesentlich geringer, als bei der konventionellen Rasterkraftmikroskopie. Artefakte, die dadurch entstehen können, wie beispielsweise das Verschieben einer weichen Topografie, entstehen bei Kraft-Abstandskurven basierter Rasterkraftmikroskopie nicht.

Möglich ist es auch Aspekte der multimodalen Rasterkraftmikroskopie in die Methode mit Kraft-Abstands Kurven einzubringen: während die Kraft-Abstands Kurven aufgenommen werden, kann der Biegebalken zu einer mono- oder multimodalen Schwingung angeregt werden. So ist es in diesem Fall möglich die Messgrößen der multimodalen Anregung (Frequenz, Amplitude, Phase) zusätzlich zu den Kraft-Abstands Kurven aufzuzeichnen und eine Kombination beider Methoden herzustellen.

3.4. Weitere Methoden der Volumenabbildung

Eine ganze Reihe weiterer Methoden erlaubt es Materialien dreidimensional und vergrößert abzubilden. Bei vielen dieser Methoden wird die zu messende Probe im Verlauf der Bildgebung verändert oder gar zerstört. Durch einen Teilchenstrahl kann eine Probe Schicht für Schicht abgetragen werden und so ihre dreidimensionale Struktur Schritt für Schritt rekonstruiert werden. Solche Verfahren werden zum Beispiel bei der Ionenstrahlmikroskopie (FIB, *Focused Ion Beam*) oder der Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) genutzt. Verfahren, die die Probe nicht abtragen und nicht dauerhaft verändern, sind möglich, wenn keine Teilchenstrahlung verwendet wird. Je nach zu untersuchender Probe kann Elektronenstrahltomografie genutzt werden, um eine dreidimensionale Darstellung der Tiefe der Probe zu erhalten. Dabei müssen komplexe Algorithmen angewandt werden, um die Struktur darzustellen [66, 67]. Ähnliches ist auch bei Verwendung von Röntgenstrahlen möglich [68, 69]. Einen guten Überblick über verschiedene Möglichkeiten gibt Referenz [70].

3.5. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die multimodale Rasterkraftmikroskopie insbesondere für Messungen eignet, bei denen eine kurze Messdauer entscheidend ist. Ebenso ist dieses Verfahren sehr gut geeignet, wenn die zu messende Probe nicht mit der Messspitze durchdrungen oder reversibel verformt werden kann. Das ist meistens bei Proben der Fall, die härter sind, als der Biegebalken. Jedoch sind hier für die unter der Oberfläche liegenden Strukturen langreichweitige Wechselwirkungen notwendig, um diese Strukturen detektieren zu können. Es ist mit dieser Methode schwer möglich, eine dreidimensionale Abbildung zu erstellen, also die Tiefenlage der Strukturen unter der Oberfläche zu bestimmen.

Die Methode über Kraft-Abstands Kurven eignet sich insbesondere für Proben die sehr weich sind – so weich, dass eine Regelung mit dynamischen rasterkraftmikroskopischen Methoden schwer möglich ist. Auch können große Probenbereiche auf einmal untersucht werden – zu Lasten der Auflösung und bei gleichzeitiger Erzeugung großen Datenmengen. Hier ist es möglich dreidimensionale Abbildungen zu erstellen und mechanische Eigenschaften auch tiefenaufgelöst unterhalb der Oberfläche zu quantifizieren. Im Gegensatz zu vielen anderen Methoden, arbeitet die Rasterkraftmikroskopie üblicherweise zerstörungsfrei.

4. Anwendung dynamischer und multimodaler Rasterkraftmikroskopie

In diesem Kapitel sollen Beispiele für dynamische und dynamische multimodale Rasterkraftmikroskopie gezeigt werden. Die Vorteile dieser Methode sollen deutlich werden: hohe Auflösung und hohe Messgeschwindigkeit und gleichzeitig mehr Informationen über die Probe, als nur die Topografie.

Zunächst wird der experimentelle Aufbau beschrieben, der für die hier verwendete multimodale Rasterkraftmikroskopie notwendig ist (Abschnitt 4.1). In den beiden Abschnitten 4.2 und 4.3 wird der Biegebalken der Messspitze noch monomodal angeregt: hier sollen die konventionellen Fähigkeiten der Rasterkraftmikroskopie beispielhaft gezeigt werden. In 4.4 wird gezeigt, wie mittels multimodaler Rasterkraftmikroskopie ein Materialkontrast und eine mechanische Quantifizierung gleichzeitig möglich ist, in 4.5 wird diese Anregung zur getrennten Detektion magnetischer Wechselwirkungen von der Topografie verwendet.

4.1. Experimenteller Aufbau für frequenzmodulierte bimodale Rasterkraftmikroskopie

Die meisten kommerziell erhältlichen Rasterkraftmikroskope unterstützen nativ keine multimodale Anregung des Biegebalkens bei gleichzeitiger frequenzmodulierter Regelung von zwei Eigenmoden. Das liegt insbesondere an einem Wechsel des Vorzeichens (siehe [Abbildung 12](#)) der Steigung der Frequenzverschiebung bei Annäherung an die Oberfläche: dieser erschwert eine zuverlässige Regelung und macht ein frequenzmoduliertes Annähern der Spitze an die Probenoberfläche zu sehr kleinen Abständen unmöglich, da die Regelung durch den Vorzeichenwechsel versagt und die Spitze schneller werdend auf die Oberfläche aufsetzt. Abhilfe schafft hier eine externe Anregung des Biegebalkens bei gleichzeitigem Auslesen der Frequenzverschiebung und Amplitude der Schwingung durch eine Phasenregelschleife und einen Lock-In-Verstärker. Das Annähern der Spitze an die Probenoberfläche kann in diesem Fall mit amplitudenmodulierter Regelung erfolgen und es muss möglich sein, verzögerungsfrei auf eine frequenzmodulierte Regelung umzuschalten. Dieses Vorgehen wird in 4.5 verwendet.

Dazu wird hier ein Cypher S Rasterkraftmikroskop (Oxford Instruments, Asylum Research, Santa Barbara, USA) in Verbindung mit einer HF2PLL (Zürich Instruments AG, Zürich, Schweiz) Phasenregelschleife und einem Rigol DS1102E (Rigol Technologies

EU GmbH, Puchheim, Deutschland) Oszilloskop verwendet. Mittels photothermischer Anregung wird der Biegebalken in seinen ersten beiden Eigenmoden zum Schwingen gebracht. Durch zwei PID-Regler werden die Amplituden der Schwingungen konstant gehalten. Die beiden Phasenregelschleifen arbeiten parallel zueinander und verfolgen die jeweilige aktuelle Frequenz der jeweiligen Schwingung.

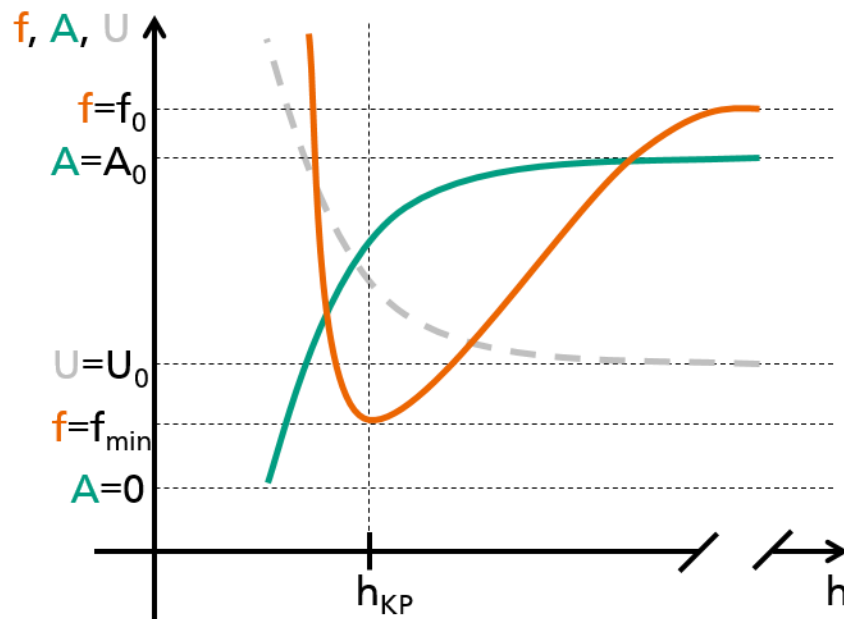


Abbildung 12 Schema des Verlaufs von Frequenz f (orange) und Amplitude A (grün) bei Annäherung der Messspitze an die Probenoberfläche. Bemerkenswert ist der Wechsel des Vorzeichens der Steigung der Frequenz in der Nähe des Kontaktpunkts. In grauer Farbe und gestrichelt ist der Verlauf der Anregungsspannung U der Schwingung im Fall der Annäherung an die Oberfläche dargestellt.

Zum Annähern der Spitze an die Probenoberfläche wird als Auslöser die Anregungsspannung der ersten Eigenschwingung, U , verwendet². Die Frequenz der Schwingung wird verfolgt und dargestellt, um einen Wechsel in der Steigungsrichtung bemerken zu können. Die Spitze wird soweit an die Probenoberfläche herangefahren, bis das Vorzeichen der Steigung der Frequenz der ersten Eigenschwingung wechselt (**Abbildung 12**, Position des Kontaktpunktes). Ist dieser „ansteigende Ast“ der Frequenz erreicht, wird die Annäherung gestoppt und das Regelsignal auf die Frequenz der ersten Eigenmode umgestellt. Jetzt ist eine frequenzmodulierte Regelung auf die erste Eigenmode aktiv

² Details zu diesem Vorgehen sind im Anhang zu finden.

und es kann mittels bimodaler frequenzmodulierter Rasterkraftmikroskopie gemessen werden.

4.2. Hohe Auflösung auf großer Fläche

Eine Standardaufgabe der Rasterkraftmikroskopie ist das Abbilden der Topografie einer Oberfläche. Das folgende Beispiel soll zeigen, dass dies mit hoher, das heißt sub-nanometer großer Auflösung, auch auf großen Flächen, das bedeutet maximalen Messbereichen, möglich ist. Die folgenden Ergebnisse wurden in [33] veröffentlicht.

Metallische Nanopartikel werden häufig zur Anwendung in Sensoren gebracht [15, 71-73] und finden zunehmend Einsatz in der Biomedizin [74-77]. Das liegt insbesondere an ihren besonderen Eigenschaften: dem großen Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, der diskreten Energieverteilung als Quantenpunkt oder besonderen magnetischen Eigenschaften, wie dem Vorhandensein einer einzelnen ferromagnetischen Domäne oder Superparamagnetismus. Ob sich ein Nanopartikel aus einem ferromagnetischen Material auch ferromagnetisch verhält oder Superparamagnetismus zeigt, hängt insbesondere von seiner Größe ab. Unterhalb einer gewissen Größe des Nanopartikels ist die thermische Energie bei Raumtemperatur groß genug, um Fluktuationen der Richtung der Magnetisierung zu erzeugen [78]. Damit sollte sich auch das Aggregationsverhalten der Nanopartikel verändern. Das lässt sich zeigen, indem man die zweidimensionale Anordnung von Nanopartikeln unterschiedlicher Größe untersucht. Die Frage ist, ob sich nm-große Partikel wie μm -große Teilchen verhalten. Das Verhalten von größeren Teilchen ist zum Beispiel bei Ferrofluiden bekannt. In Ferrofluiden tritt die Dipol-Dipol Wechselwirkung in Erscheinung.

4.2.1. Experimentelles

Um dieser Frage nachzugehen, wurden sphärische Eisenoxid-Nanopartikel mit Durchmessern von 5 und 10 nm verwendet, die durch eine hydrophobe Ölsäure-Schale gegen Agglomerieren stabilisiert sind (Ocean Nanotech, San Diego, USA). Die Größe dieser Teilchen wurde mittels Röntgenkleinwinkelstreuung bestimmt. Der Teilchendurchmesser für die nominell „10 nm Teilchen“ ergab sich als 12,8 ($\pm 0,1$) nm, während die kleineren Teilchen eine ellipsoide Form mit Durchmessern von 7,8 ($\pm 0,1$) nm und

4,8 ($\pm 0,1$) nm aufweisen. In einem Polymerfilm (Poly(ethylenglycol)-b-poly(n-butylacrylat)) wurden diese Nanopartikel als Langmuir-Blodgett Film [79, 80] auf Silizium Wafer übertragen und damit ein zweidimensionales System erzeugt. Das System besteht aus einer weichen Matrix und dazu vergleichsweise festen Teilchen und lässt sich durch diese Unterschiede gut mit Rasterkraftmikroskopie abbilden. Die Messung im Rasterkraftmikroskop (Cypher S, Oxford Instruments) erfolgte im dynamischen, amplitudenmodulierten Modus an Luft, unter Normalbedingungen. Als „Cantilever“ wurden Multi75Al-G (BudgetSensors, Sofia) mit einer typischen Federkonstante von 3 N/m und einer Resonanzfrequenz von typisch 75 kHz verwendet. Die Daten der Topografie der Oberfläche wurden mit einem Polynom 4. Grades korrigiert, um ein Kriechen (circa 2 nm bei einer Rastergröße von 30 μm) der Rastereinheit des Mikroskops während der Messung auszugleichen.

4.2.2. Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 13 zeigt die Topografie der Oberfläche von zwei Proben: eine mit Nanopartikeln mit einem nominellen Radius von 5 nm, die andere mit Nanopartikeln mit einem nominellen Radius von 10 nm.

Die Oberfläche des Polymerfilms, in dem sich die Nanopartikel befinden, und die Oberfläche des Substrats sind nicht dargestellt um die Eigenschaften der Nanopartikel deutlich hervorzuheben. Die Rauheit des Films ist geringer als 3 nm.

Obwohl die Methode der Herstellung der Proben in beiden Fällen die gleiche ist, ist die Anordnung der Nanopartikel auf der Oberfläche sehr unterschiedlich. Die kleineren Partikel liegen zufällig, gleichverteilt und meistens einzeln vor, oder bilden runde Agglomerate (**Abbildung 13 a**). Die größeren Nanopartikel hingegen bilden Objekte aus Ketten mehrerer Nanopartikel, deren Länge unterschiedlich ist (**Abbildung 13 b**). Das Aggregationsverhalten der beiden Nanopartikel ist folglich unterschiedlich.

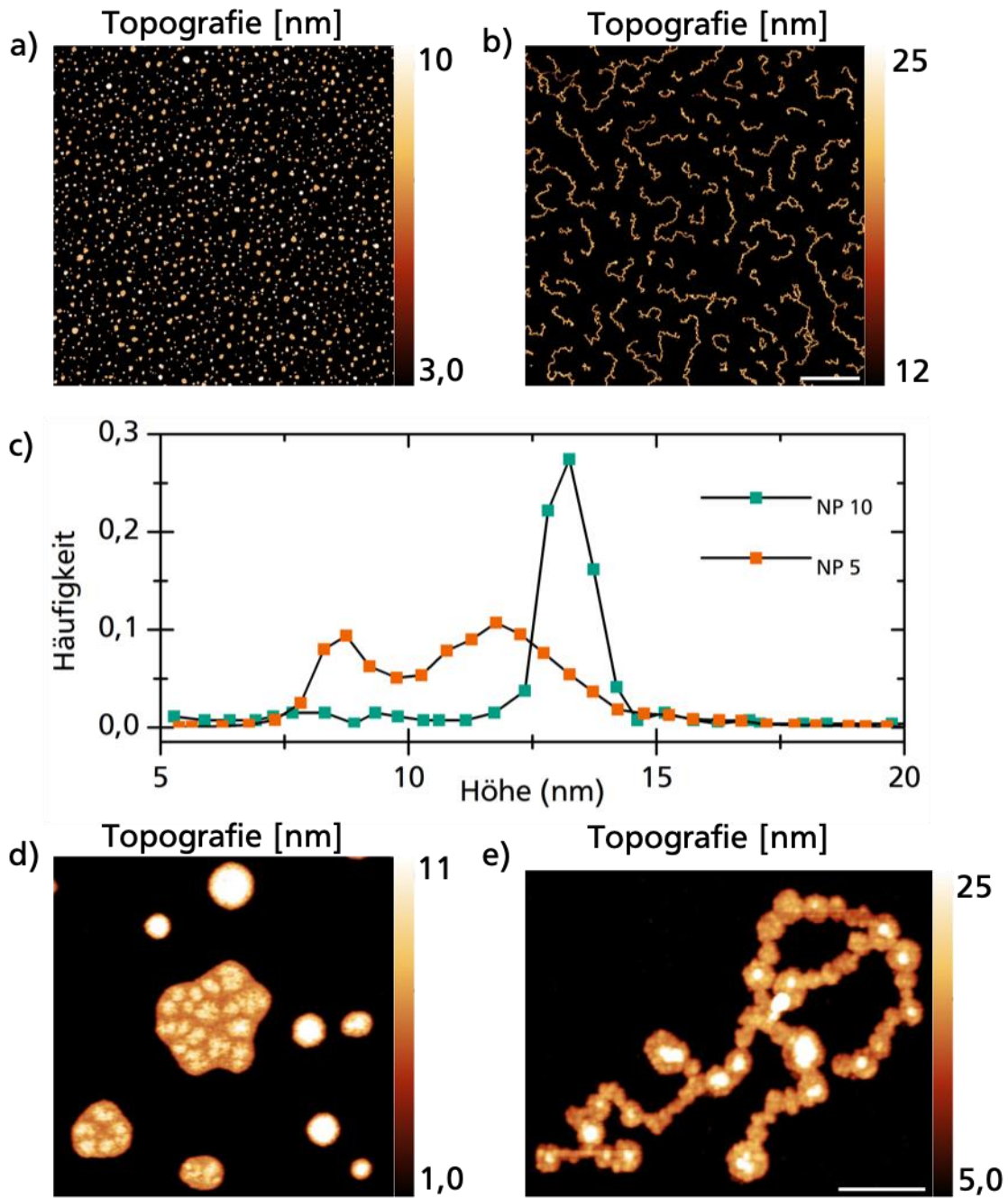


Abbildung 13 Eisenoxid-Nanopartikel in einem Polymerfilm auf einem Silizium-Substrat. Die Nanopartikel in a) haben einen nominellen Radius von 5 nm, die Nanopartikel in b) einen nominellen Radius von 10 nm. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 5 μm . Die Herstellungsmethode für beide Proben ist gleich, jedoch ist die Verteilung der Nanopartikel auf der Probe deutlich unterschiedlich. In c) ist die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Partikelhöhen für beide Proben separat dargestellt. Auffallend ist, dass die kleineren Nanopartikel zwei unterschiedliche Maxima aufweisen, was auf die Ausbildung einer zweiten Schicht hinweist. In d) und e) sind die Nanopartikel aus a) und b) in einer höheraufgelösten Messung dargestellt, sodass die einzelnen Nanopartikel einzeln erkennbar sind. Die Länge des Skalenbalkens beträgt hier 500 nm.

Eine genauere Unterscheidung des Aggregationsverhaltens ist durch eine detaillierte Analyse der Struktur der Aggregate möglich. Dazu wird wenn die Fläche der entstandenen Objekte in Abhängigkeit von deren Gyrationradius betrachtet wird. Dazu wird zunächst jedes Objekt einzeln identifiziert, als eine Domäne mit einer Höhe von mindestens 4 nm. Für jedes dieser Objekte wird, als Maß ihrer Ausdehnung, der Gyrationradius bestimmt. Als Längen- und als Flächeneinheit wird „Pixel“ verwendet. Ebenso wurde für jedes Objekt dessen Fläche bestimmt und in Anzahl Pixel angegeben. Zwischen der Fläche in Anzahl Pixel (N) und dem Gyrationradius (r_g) besteht ein exponentieller Zusammenhang, $N \propto r_g^d$. d ist für fraktale Objekte die fraktale Dimension. In **Abbildung 14** ist für beide Partikelgrößen diese Abhängigkeit in doppellogarithmischer Darstellung ausgewertet. Die numerische Auswertung umfasst 4655 Objekte (**Abbildung 14 a**) beziehungsweise 266 Objekte (**Abbildung 14 b**)

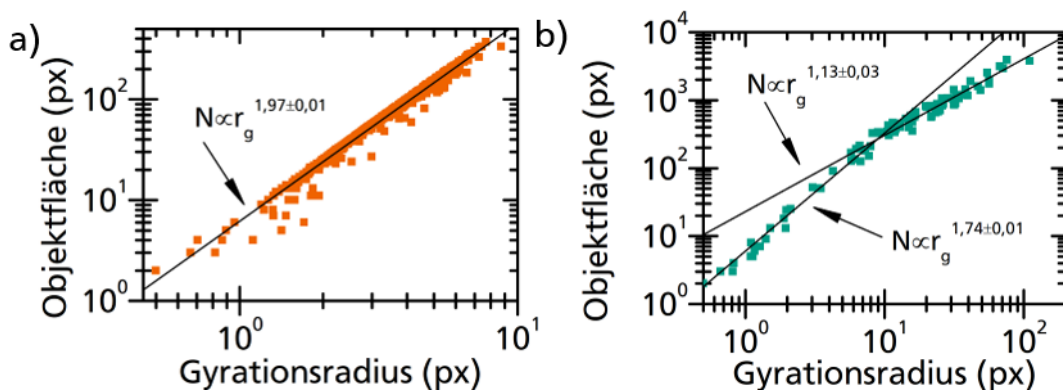


Abbildung 14 Doppellogarithmische Darstellung der Oberfläche eines Objekts (Größe in Pixel) in Bezug zum Gyrationradius des Objekts (Länge in Pixel). Die Abbildung a) bezieht sich auf die Nanopartikel mit einem nominellen Radius von 5 nm, Abbildung b) auf die Nanopartikel mit einem nominellen Radius von 10 nm.

In der logarithmischen Darstellung von **Abbildung 14** lässt sich ein klar unterschiedliches Verhalten für die beiden unterschiedlichen Größen der Nanopartikel erkennen. Während in **Abbildung 14 a**) die kleineren Nanopartikel mit einem Exponenten beschrieben werden können, ergeben sich für die größeren Nanopartikel in **Abbildung 14 b**) zwei unterschiedliche Exponenten: ab einem Gyrationradius von 10 Pixeln flacht der Exponent ab.

Die fraktale Dimension (Ähnlichkeits-Dimension) ist definiert als:

$$d = \frac{\log N}{\log r_g} \quad (20)$$

Diese Dimension beschreibt (im zweidimensionalen Fall) die Eigenschaft eines Objekts eine Fläche auszufüllen. Ein Objekt mit der Dimension 1 ist eine gerade Linie, ein Objekt mit der Dimension 2 füllt die Fläche kompakt aus. Die Aggregate der kleineren Nanopartikel haben eine fraktale Dimension von $d_5=1,97$ und verhalten sich damit wie ein flächenfüllendes Objekt. Die größeren Nanopartikel haben im Fall der kleineren Objekte eine fraktale Dimension von $d_{10,\text{klein}}=1,74$ und im Fall der größeren Objekte von $d_{10,\text{groß}}=1,13$. Die Nanopartikel in größeren Objekten tendieren in ihrem Verhalten demnach zu dem einer geraden Linie, wohingegen die Nanopartikel in kleineren Objekten sich kompakter zusammenlagern.

Für magnetische Nanopartikel kann man erwarten, dass diese Ketten bilden um die magnetischen Dipole parallel zueinander ausrichten zu können. Dem gegenüber steht die thermische Fluktuation der Teilchenorientierung entgegen. Das konnte sowohl in Simulationen [81] und experimentellen Messungen [82] bereits gezeigt werden. Hier zeigt sich für den Fall der Nanopartikel mit einem nominellen Radius von 10 nm: Erreichen die Objekte eine kritische Größe (hier einen Durchmesser von circa 10 Pixeln), dann dominieren die dipolaren, magnetischen Wechselwirkungen und das Bilden von Ketten wird favorisiert. Die fraktale Dimension passt sehr gut zu den aus Simulationen in [81] erhaltenen Werten, für den Fall einer dominierenden Dipol-Dipol Wechselwirkung. Bei Objekten unterhalb dieser Größe scheint die Zusammenlagerung durch einen anderen Mechanismus dominiert zu werden. Simulationen in [83] haben gezeigt, dass die hier gefundene fraktale Dimension auftritt, wenn die Dipol-Dipol Wechselwirkung nicht der dominierende Mechanismus ist, sondern die Anlagerung begrenzt durch Diffusion verläuft. Diese ist hier wiederum durch den Polymerfilm verlangsamt. Die Nanopartikel mit einem nominellen Radius von 5 nm bilden hingegen keine Ketten, sondern füllen die Oberfläche gleichmäßig aus. Eine magnetische Dipol-Dipol Wechselwirkung scheint hier nicht die treibende Kraft zu sein.

4.3. Materialkontrast in polymergefüllten Nanoröhren

Neben der Darstellung der Topografie wie in Kapitel 4.2 ist ein einfacher Materialkontrast schon bei monomodalen, dynamischen Messungen möglich. Eine qualitative Unterscheidung von verschiedenen Materialien kann aus dem Signal der Phasenverschiebung direkt gewonnen werden. Als Beispiel dient hier niedermolekulares Polyethylenglycol (PEG) das in einem begrenzten Raum auskristallisiert ist. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind Bestandteil der Veröffentlichung in [34].

4.3.1. Experimentelles

Diese „begrenzten Räume“ wurden in einer 30 μm dicken Folie aus Polycarbonat erzeugt. Dazu wurde die Folie mit Au^{25+} Ionen beschossen (UNILAC Linearbeschleuniger, GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung, Darmstadt) [84, 85]. Dadurch entstehen parallele, aber zufällig angeordnete Ionenspuren durch die Folie [86]. Ein anschließendes Ätzen der Folie in Natronlauge und Bestrahlung mit UV-Licht, erzeugt offene, durchgängige Poren, deren Radius von der Ätzzeit abhängig [87] und somit einstellbar ist. Mittels Atomlagenabscheidung wurden die Poren mit SiO_2 beschichtet, um eine gleichmäßige und temperaturstabile Oberfläche zu erhalten. Das PEG wurde anschließend mittels Schmelzinfiltration in die Poren eingebracht. Details zu diesem Vorgehen und Ergebnisse die nicht die Rasterkraftmikroskopie betreffen, können in Referenz [34] gefunden werden.

Dynamische, amplitudenmodulierte Rasterkraftmikroskopie wurde sowohl auf Folien mit ungefüllten Poren, wie auch auf Folien mit PEG-gefüllten Poren durchgeführt: so wird zum einen die Verteilung der Poren und zum anderen die Struktur des PEG in einer Pore sichtbar.

4.3.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Verteilung der erzeugten Poren in der PC Folie und deren unterschiedliche Größe, durch unterschiedliche Ätzzeiten, lässt sich in **Abbildung 15** a) und b) erkennen. Die Verteilung ist zufällig. An einigen Stellen liegen die Poren so dicht beieinander, dass sie zu einem größeren Objekt zusammengewachsen sind. Der Durchmesser der Poren ist

sehr unterschiedlich: während in a) der Durchmesser circa 10 nm beträgt, sind es in b) circa 30 nm. Innerhalb einer Folie sind die Durchmesser jedoch sehr einheitlich.

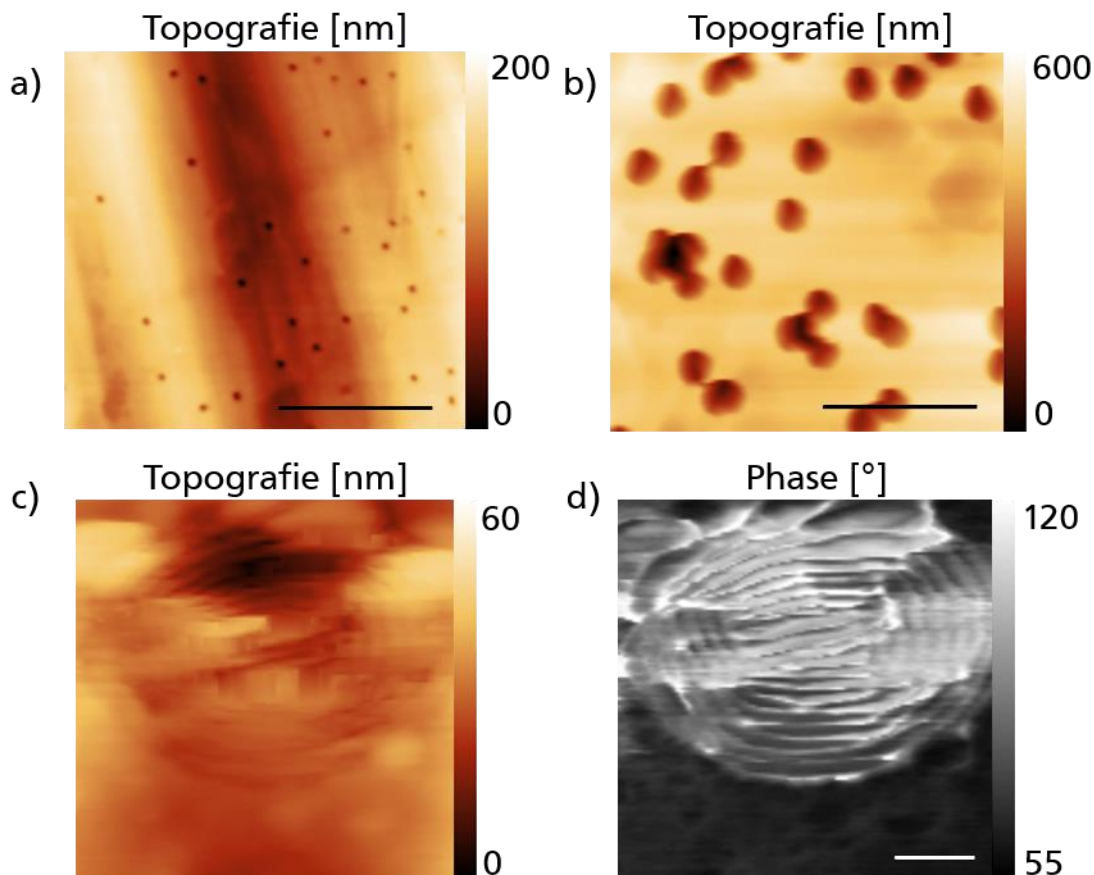


Abbildung 15 Ungefüllte und gefüllte Löcher in Polycarbonatfolie. a) und b) zeigen die Verteilung dieser Löcher durch die Ionenbestrahlung und deren unterschiedliche Größe durch unterschiedliche Ätzeiten. In c) und d) ist ein einzelnes, mit PEG gefülltes Loch gezeigt, die Topografie in c) und das Phasensignal – und damit der Materialkontrast – in d). Eine konzentrische Struktur aus amorphen und kristallinen Bereichen ist zu erkennen. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 μm für a) und b), sowie 50 nm für c) und d).

In c) und d) ist eine einzelne, mit PEG gefüllte Pore abgebildet. Bei c) handelt es sich um die Topografie der Probe an dieser Stelle, bei d) um das Phasensignal der Messung. In der Topografie lässt sich die Pore gerade so als rundes Objekt erkennen. Die Oberfläche ist nicht glatt, es lassen sich verschiedene Strukturen der PEG Oberfläche erkennen, im Bereich der Pore, aber auch daneben. Andeutungsweise ist an einigen Stellen eine konzentrische Struktur im Inneren der Pore sichtbar. Diese konzentrische Struktur ist in d), dem Phasensignal, sehr deutlich sichtbar. Die Phasenverschiebung zeigt Unterschiede in der bei jedem Schwingungszyklus in die Probe eingetragenen Energie. Dadurch ist ein Materialkontrast möglich. In diesem Fall kann zwischen amorphen und kristallinen Bereichen des PEG unterschieden werden. Die Deformation, und damit der

Energieeintrag während eines Schwingungszyklus, ist im Amorphen größer, als im Kristallinen. Die unterschiedlich dunklen und hellen, kreisförmigen Bereiche in der Pore zeigen entsprechend ein konzentrisches amorph-kristallines Wachstum des PEG in der Pore. Die Zuordnung der gefundenen Strukturen zu amorphen und kristallinen Bereichen wurde durch temperaturabhängige Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen bestätigt.

Dieses Beispiel zeigt deutlich, dass bereits mit einfachen monomodalen, dynamischen rasterkraftmikroskopischen Verfahren mehr als die Topografie ausgewertet werden kann – hier ein qualitativer Materialkontrast.

4.4. Materialkontrast bei Block-Copolymeren

Schon die monomodale dynamische Rasterkraftmikroskopie ermöglicht einen Materialkontrast (siehe 4.3) neben der Topografie einer Probenoberfläche. Bimodale Rasterkraftmikroskopie ermöglicht zusätzliche Observablen und dadurch einen neben Materialkontrast auch eine mechanische Quantifizierung der Materialien. In dem folgenden Beispiel wurde ein dünner Film eines Styrol-Butadien-Copolymers (SB) untersucht. Das Polymer besteht aus den beiden Blöcken Styrol und Butadien. Beide Blöcke bilden amorphe Strukturen.

4.4.1. Experimentelles

Das Copolymer Poly(Styrol)-B-Poly(1,4-Butadien) (PS(13600)-b-PBd(33700), 5 mg Polymer Source Inc., Dorval, Kanada) wurde in 5 ml Toluol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und anschließend mittels Rotationsbeschichtung (1 Min bei 1800 U/min) auf einen Siliziumwafer aufgetragen und direkt im Anschluss im Rasterkraftmikroskop (Cypher S, Asylum-Research Oxford Instruments, Goleta, USA) vermessen. Dazu wurde der Biegebalken (in diesem Fall „Arrow UHF AuD“, NanoWorld, Neuchâtel, Schweiz) in Bezug auf Eigenfrequenzen, Sensitivität und Federkonstante kalibriert und in seinen ersten beiden Eigenschwingungen angeregt.

Tabelle 5 gemessene Daten des Biegebalkens

Arrow UHF AuD	Erste Eigenschwingung	Zweite Eigenschwingung
Frequenz	1,198 MHz	3,587 MHz
Federkonstante	2,66 N/m	23,62 N/m
Qualitätsfaktor	163	245

Für die Kalibrierung höherer Eigenmoden eignet sich die Methode über das thermische Rauschen [88] besser [89], als die „Sader-Methode“ [40] (siehe auch Kapitel 2.1), weswegen hier über das thermische Rauschen kalibriert wurde. Die Regelung verlief frequenzmoduliert auf die Frequenzverschiebung der ersten Eigenschwingung durch eine externe Phasenregelschleife (HF2PLL, Zurich Instruments, Zürich, Schweiz). Die Verschiebung der zweiten Eigenfrequenz und der Amplituden wurde gemessen und als Materialkontrast ausgewertet.

4.4.2. Ergebnisse und Diskussion

Die Messung erfolgte auf einer zufällig ausgewählten Stelle auf der Probe und ist in **Abbildung 16** dargestellt.

Die Topografie (**Abbildung 16 a**) der Probenoberfläche ist glatt im Bereich weniger Nanometer. Eine „innere Struktur“ der Probe lässt sich aus der Topografie nicht erkennen. Ebenso glatt ist die Verschiebung der Resonanzfrequenz (**Abbildung 16 b**) – das zeigt das gute Funktionieren der Regelung. In der Abbildung der Verschiebung der zweiten Frequenz (**Abbildung 16 c**) ist jedoch ein deutlicher Kontrast zu sehen: helle, circa 20 nm breite Blöcke lassen sich erkennen, die eine an ein Labyrinth erinnernde Struktur bilden. Die Frequenzverschiebung der zweiten Eigenschwingung ist hier sensitiv für einen Materialkontrast aufgrund der unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der beiden Domänen des Co-Polymers. Polybutadien liegt aufgrund seiner niedrigen Glasübergangstemperatur von deutlich unter 0 °C (zwischen -107 bis -95 °C) [90] als weiches Elastomer vor, wohingegen das Polystyrol, mit einer Glasübergangstemperatur von circa 100 °C [90], als amorpher Feststoff vorliegt. Entsprechend der

Unterschiede des Elastizitätsmoduls werden die beiden Blöcke in der Frequenzverschiebung der zweiten Eigenschwingung abgebildet. Die Strukturbildung erfolgt während des Rotationsbeschichtungsprozess: es findet eine Mikrophasenseparation in PS und PB Domänen statt.

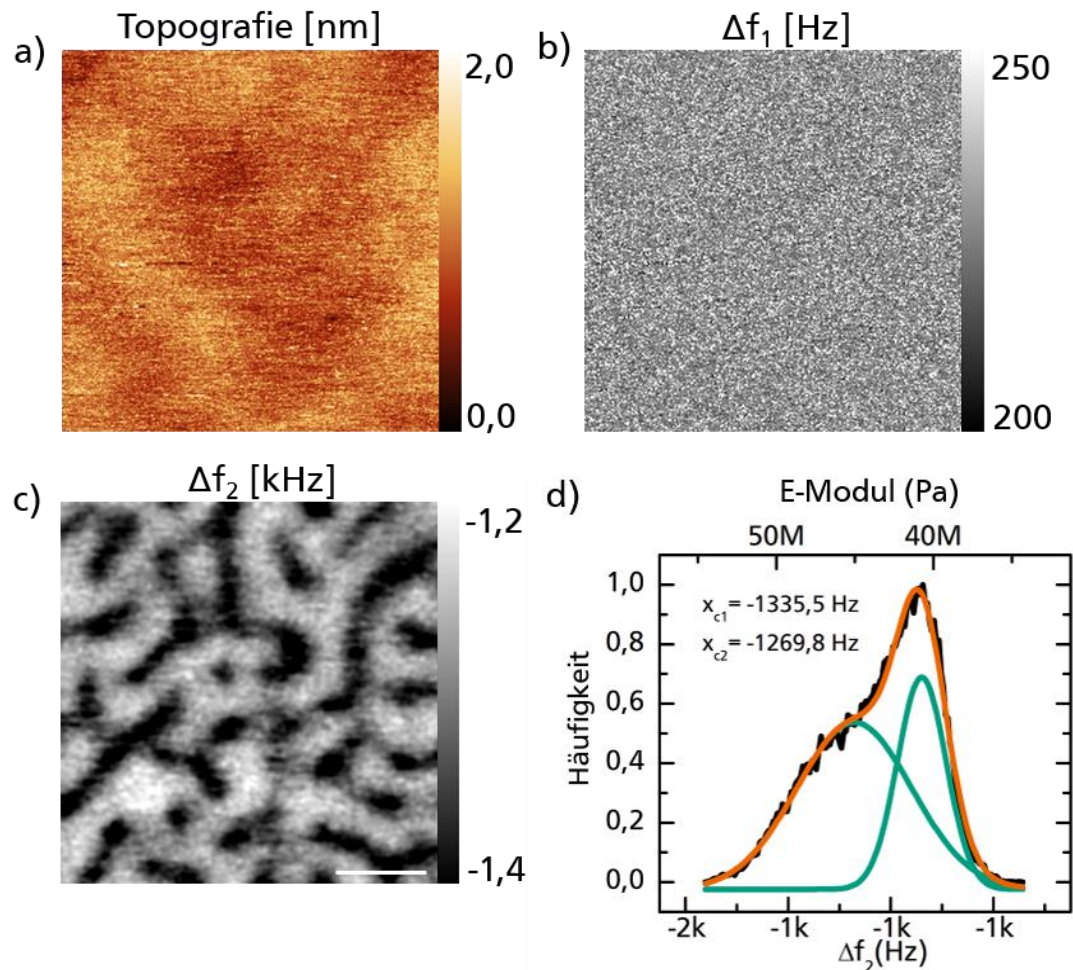


Abbildung 16 Bimodale Rasterkraftmikroskopie eines Films Styrol-Butadien-Copolymer. In a) ist die Topografie der Oberfläche dargestellt, b) zeigt das Regelsignal, die Frequenzverschiebung der ersten Eigenfrequenz, in c) wird durch die Frequenzverschiebung der zweiten Eigenfrequenz die Block-Struktur der Probe sichtbar. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 50 nm. In d) ist die Häufigkeitsverteilung (schwarze Linie) der Frequenzverschiebung aus c) dargestellt, sowie der zugehörige E-Modul. Zwei unterschiedliche Gauß-Verteilungen konnten identifiziert werden (grüne Linien), deren Summenkurve ist ebenfalls dargestellt (orangene Linie). Die Maxima dieser Verteilungen liegen bei $x_{c1} = -1335,5$ Hz und $x_{c2} = -1269,8$ Hz.

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung (Abbildung 16 d, schwarze Linie) der Frequenzverschiebung (beziehungsweise des E-Moduls) der gesamten Messung, so lassen sich die beiden Blöcke nicht streng voneinander trennen. Erst eine Analyse der Verteilung mittels zweier Gauß-Verteilungen (Abbildung 16 d, grüne Linien) zeigt die beiden

Maxima, die den beiden Blöcken des Co-Polymers zugeordnet werden kann. Bei dieser Messmethode lässt sich aus der Verschiebung der zweiten Eigenfrequenz der E-Modul der Probe an jedem gemessenen Punkt berechnen [91]:

$$E = \sqrt{\frac{8}{R \cdot A_1} \cdot \frac{k_2^2}{k_1} \cdot \frac{f_{01}}{f_{02}^2} \cdot \frac{\Delta f_2^2}{\Delta f_1}} = \sqrt{\frac{8}{10 \text{ nm} \cdot 8 \text{ nm}} \cdot \frac{23,62 \frac{\text{N}}{\text{m}}}{2,66 \frac{\text{N}}{\text{m}}} \cdot \frac{1,198 \text{ MHz}}{3,587 \text{ MHz}^2} \cdot \frac{\Delta f_2^2}{250 \text{ Hz}}} \quad (21)$$

Hierbei ist R der Endradius der Messspitze, A_1 die Amplitude der ersten Eigenschwingung, k_1 und k_2 die Federkonstanten des Biegebalkens bei der ersten beziehungsweise der zweiten Eigenschwingung, f_{01} und f_{02} die erste beziehungsweise die zweite Eigenfrequenz des Biegebalkens und Δf_1 und Δf_2 die jeweiligen Frequenzverschiebungen.

Dabei ist die Kenntnis über durch das Experiment selbst festgelegte Parameter (hier: grün), gewählte Messparameter (hier: blau) und gemessene Größen (hier: orange) notwendig. Die Berechnung des E-Moduls kann auf einen Vorfaktor und die Frequenzverschiebung reduziert werden:

$$E = 24,7 \left[\frac{\text{N} \cdot \text{s}^2}{\text{m}^2} \right] \cdot \Delta f_2^2 \quad (22)$$

Alle Parameter sind hier fehlerbehaftet, jedoch ist der Vergleich der erhaltenen Elastizitätsmodule innerhalb einer Messreihe davon nicht betroffen und somit möglich. Aus der Häufigkeitsverteilung lassen sich die E-Modulen der beiden Phasen ablesen: $x_{c1} \approx -1335,5 \text{ Hz} \stackrel{\text{def}}{=} 44,1 \text{ MPa}$ und $x_{c2} \approx -1269,8 \text{ Hz} \stackrel{\text{def}}{=} 39,8 \text{ MPa}$. Mit diesen Informationen können die hellen und dunklen Bereiche in **Abbildung 16 c)** zugeordnet werden. Die helleren Bereiche, also geringere Frequenzverschiebung und damit kleinerer E-Modul entspricht dem Polybutadien-Block und die dunkleren Bereiche dem Styrol-Block des Co-Polymers. Augenscheinlich überwiegt das Polybutadien in der Abbildung der Fläche.

Da die Dichten von Polybutadien und Polystyrol ähnlich sind ($1,01 \text{ g/m}^3$ [90] und $1,06 \text{ g/m}^3$ [90]), lässt sich deren Volumenverhältnis leicht über das Verhältnis der Molmassen abschätzen:

$$f_{PS} = \frac{V_{PS}}{V_{PS} + V_{PB}} \approx \frac{M_{PS}}{M_{PS} + M_{PB}} = \frac{13600}{13600 + 33700} \approx 0,29 \quad (23)$$

Der optische Eindruck von **Abbildung 16 c)** wird dadurch bestätigt: das Polystyrol liegt in der Minderheit vor. Ein Volumenverhältnis von $f \approx 0,3$ begünstigt zylindrische PS Domänen in einer PB Matrix [92]. Obwohl die beiden Blöcke in unterschiedlichen Zuständen vorliegen (amorph, glasartig erstarrt), sind die E-Modulen in **Abbildung 16 d)** nicht klar voneinander zu trennen. Der Grund dafür wird in **Abbildung 16 c)** ersichtlich: die Strukturgröße der Blöcke liegt ungefähr im Bereich von 20 nm. Bei einem Spitzenradius von 10 nm tritt auf dieser Größenskala der Faltungseffekt zwischen Geometrie der Spitze und Topografie der Oberfläche deutlich hervor. Die weiche PB Matrix kann diesen Effekt noch begünstigen, wenn die PS Zylinder unter einer dünnen Schicht PB verborgen liegen und die mechanischen Eigenschaften des PS dadurch gedämpft werden. Aber auch in diesem Fall können diese im Volumen der Probe liegenden Strukturen detektiert und dargestellt werden. Hinzu kommt insbesondere aber auch die Abhängigkeit des gemessenen E-Moduls von der Messfrequenz bei Polymeren: bei der hier im Megaherzbereich liegenden Messfrequenz kann das PB bereits glasig erscheinen.

4.5. Magnetischer Kontrast unter einer Oberfläche

Nachdem in zwei Beispielen gezeigt werden konnte, dass ein Materialkontrast mit Rasterkraftmikroskopie möglich ist, soll hier auf die magnetischen Eigenschaften eines Materials eingegangen werden. Das ist insbesondere deswegen interessant, weil die magnetischen Wechselwirkungen eine, zum Beispiel im Vergleich zu van der Waals Wechselwirkungen, lange Reichweite haben (siehe auch 2.2) und damit genutzt werden können, um Strukturen unterhalb einer Oberfläche sichtbar zu machen.

Das hier verwendete Messverfahren entspricht dem im Abschnitt 4.1 vorgestellten Vorgehen.

4.5.1. Experimentelles

Bei der hier dargestellten Probe handelt es sich um eine handelsübliche magnetische Festplatte eines Computers. Zur Herstellung der Probe wurde ein zentimetergroßes Stück der magnetischen Scheibe der Festplatte mit einer scharfen Zange herausgeschnitten und mit Sekundenkleber auf ein rundes Metallplättchen geklebt. Es erfolgte

keine weitere Behandlung der Probe, sie wurde direkt im Rasterkraftmikroskop gemessen. Dazu wurde ein Biegebalken „MESP V2“ (Bruker AFM Probes Nanofabrication Center, Camarillo, USA) mit den gemessenen Eigenfrequenzen $f_{01} \approx 66 \text{ kHz}$ und $f_{02} \approx 420 \text{ kHz}$ verwendet. Dieser hat eine permanentmagnetische Beschichtung der Messspitze aus einer Kobalt-Chrom-Legierung und ist dadurch sensitiv für magnetische Wechselwirkungen. Die frequenzmodulierte Regelung erfolgte extern, in einer Phasenregelschleife (HF2PLL, Zürich Instruments, Zürich, Schweiz) auf die erste Eigenfrequenz, die Verschiebung der zweiten Eigenfrequenz wurde gemessen. Zusätzlich wurde parallel dazu die „klassische“ Methode [93, 94] der Detektion magnetischer Wechselwirkungen in der Rasterkraftmikroskopie angewandt: in einem zweiten Schritt, nachdem die Topografie einer gemessenen Zeile bekannt ist, wird diese Zeile erneut gemessen, aber mit einem definierten Abstand zur Topografie (hier: 30 nm).

4.5.2. Ergebnisse und Diskussion

Das Ergebnis der Messung ist in [Abbildung 17](#) dargestellt. Die Topografie der Oberfläche der Festplatte ist in [Abbildung 17 a\)](#) zu erkennen.

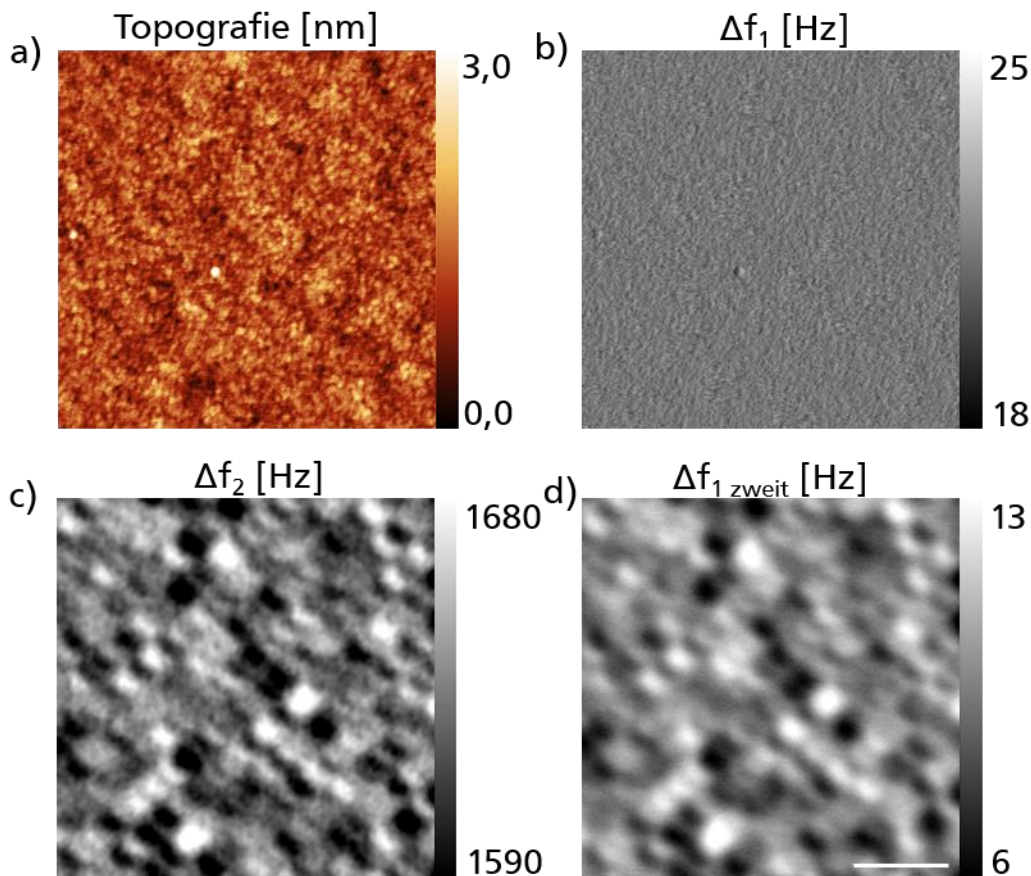


Abbildung 17 Magnetische Festplatte eines Computers, gemessen mit bimodaler frequenzmodulierter Rasterkraftmikroskopie. In a) ist die Topografie der Oberfläche der Festplatte dargestellt, b) zeigt das Regelsignal, die Verschiebung der ersten Eigenfrequenz. Der magnetische Kontrast der Festplatte ist in c) und in d) zu sehen. In c) ist der magnetische Kontrast durch die Verschiebung der zweiten Eigenfrequenz und in d) durch das „Regelsignal“ im Fall einer nochmaligen Messung der jeweiligen Zeile in einem Abstand von 30 nm zur Oberfläche (=„klassische“ Messmethode) zu sehen. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 500 nm.

Die Rauheit dieser Oberfläche ist geringer als 1 nm nur an zwei Stellen ist eine rundliche Erhebung von circa 3 nm Höhe zu erkennen. Diese beiden Erhebungen lassen sich auch im Regelsignal, der Frequenzverschiebung der zweiten Eigenfrequenz, in **Abbildung 17** b) identifizieren. Einen magnetischen Kontrast findet man in den Observablen Δf_2 c) und $\Delta f_{1\text{zweit}}$ d). Der Kontrast in **Abbildung 17** c) wird durch die Frequenzverschiebung der zweiten Eigenschwingung generiert. Diese ist sensitiv für langreichweitige Wechselwirkungen, wie die magnetische Wechselwirkung (siehe auch 3.1). Die verschiedenen Informationseinheiten sind als begrenzte, helle und dunkle Objekte zu erkennen, die in Spuren angeordnet sind. Der Kontrast in d) entsteht durch die Verschiebung der Frequenz der ersten Eigenschwingung bei dem erneuten Messen der einzelnen Zeilen im definierten Abstand von 30 nm oberhalb der Oberfläche. Die topografieerzeugenden Wechselwirkungen sind hier bereits abgeklungen, die verbleibende, detektierbare


Wechselwirkung zwischen der magnetischen Messspitze und der Probe sind magnetische Wechselwirkungen. Auch hier sind die Informationseinheiten voneinander getrennt zu erkennen, jedoch wirkt die Abbildung im direkten Vergleich mit c) weichgezeichnet. Das liegt daran, dass in jedem Messpunkt aufgrund des Abstands von 30 nm der Spitze zur Oberfläche, zum einen der Wechselwirkungsbereich größer wird, da sich das magnetische Feld radial ausbreitet, und zum anderen Beiträge des magnetischen Feldes der Umgebung in Wechselwirkung mit der Messspitze treten. Das verringert die Auflösung der Bildgebung in diesem Fall.

Die bimodale magnetische Rasterkraftmikroskopie hat demnach zwei klare Vorteile gegenüber der klassischen Variante: sie ist schneller (denn eine Zeile muss nicht doppelt gemessen werden) und die laterale Auflösung ist größer (da der Abstand zwischen Messspitze und Oberfläche geringer ist).

Eine magnetische Festplatte ist ein gutes Modellsystem, mit dem gezeigt werden kann, dass Rasterkraftmikroskopie in der Lage ist, Strukturen aufzuklären, die unterhalb einer Oberfläche verborgen sind. Eine solche Festplatte ist als ein mehrschichtiges System aufgebaut [95-97]: als Trägermaterial dient oft eine Glasscheibe auf der sich eine oder mehrere wenige Nanometer dicke Zwischenschichten befinden. Auf dieser Zwischenschicht liegt die eigentliche magnetische Schicht, die die Dateninformationen enthält, mit einer Dicke von typischerweise unter 30 nm. Diese Datenschicht wird von einer Kohlenstoffschicht von circa 15 nm Dicke geschützt, auf der sich wiederum eine sehr dünne (circa 1 nm) Schicht befindet, die ein Gleiten des Schreib- und Lesekopfes verbessert. Die in der magnetischen Schicht gespeicherten Daten sind dementsprechend über die Oberfläche nicht direkt zugänglich. Mit bimodaler magnetischer Rasterkraftmikroskopie können aber diese „verborgenen“ Strukturen zugänglich gemacht werden.

4.6. Zusammenfassung

Anhand von einigen Beispielen wurde in diesem Kapitel gezeigt, dass die multimodale Rasterkraftmikroskopie nicht nur in der Lage ist mit hoher Geschwindigkeit und großer Präzision die Topografie einer Probenoberfläche abzubilden. Das gleichzeitige Anregen und separate Auswerten mehrerer Eigenschwingungen des Biegebalkens ermöglicht es mehr Informationen über die Probe zu erhalten: kurz- und langreichweitige Wechselwirkungen zwischen Messspitze und Probe können unterschieden werden. Dadurch



können mechanische Eigenschaften von der Topografie separat oder auch magnetische Eigenschaften von der Topografie separat dargestellt werden. Dieser Effekt kann genutzt werden, um Strukturen sichtbar zu machen, die unterhalb der Oberfläche liegen. Magnetische Strukturen, die unter einer Schicht liegen, die dünner ist, als die Wechselwirkungslänge des magnetischen Feldes werden sichtbar, wie zum Beispiel bei einer Computerfestplatte. Strukturen unterschiedlicher mechanischer Härte können unterhalb einer Oberfläche detektiert werden, wie zum Beispiel verschiedene Domänen eines mikrophasenseparierten Copolymers.

5. Bimodale Rasterkraftmikroskopie: getrennte Untersuchung von Hülle und Kern von Ferritin

5.1. Einführung

Ferritin ist ein Eisenspeicherprotein, das in vielen lebenden Organismen vorkommt. Es hat einen äußeren Durchmesser von circa 12 nm und beinhaltet einen Kern aus Ferrihydrit [64] mit einem Durchmesser von circa 8 nm. Ferrihydrit ist ein hexagonal kristallisierendes Mineral aus Eisenhydroxid [98]. Der Kern des Ferritin zeigt magnetische Eigenschaften [99]. Die Hülle besteht aus 24 unterschiedlichen Aminosäuren, die den Kern als Kugel einschließen. Im tierischen Körper wird Ferritin benutzt, um Eisen zu speichern, zu transportieren und kontrolliert wieder abzugeben [100-102]. Ferritin kann für eine ganze Reihe medizinischer und elektronischer Anwendungen genutzt werden [10, 103, 104] und zeigt eine hohe Stabilität gegenüber der Umgebungstemperatur: je nach Umgebung und Ferritinsubtyp ist es bis 77 °C stabil [105].

Erste Untersuchungen der Hülle von Ferritin mittels Rasterkraftmikroskopie wurden in Wasser, im Kontaktmodus durchgeführt [106]. Dabei konnte zum einen demonstriert werden, dass Rasterkraftmikroskopie eine sinnvolle Methode zur Untersuchung weicher biologischer Moleküle ist, und zum anderen, konnten Symmetrieeigenschaften der Ferritinmoleküle abgebildet werden.

Hier wird bimodale magnetische Rasterkraftmikroskopie angewandt, um magnetische und mechanische Komponenten der Spitze-Probe-Wechselwirkungen auftrennen zu können (siehe Kapitel 3.1 und Quellen [107, 108]). So ist es möglich, Details der Proteinhülle und des Kerns von Ferritinnanoteilchen genau abzubilden.

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden in Referenz [35] veröffentlicht.

5.2. Experimentelles Vorgehen

Zur Herstellung der Proben wurde die Ferritin Vorratslösung zunächst in einem zweistufigen Verfahren verdünnt: 10 μ l Ferritin Lösung (10 mg/mL in 0,15 M NaCl, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aus der Pferdemilz wurden in 1 mL deionisiertem Wasser verdünnt und für 5 min bei 800 Umdrehungen pro Minute homogenisiert (Thermo-Mixer, Eppendorf, Wessling-Berzdorf, Deutschland). 10 μ L der so hergestellten Lösung

wurden nochmals in 1 mL deionisiertem Wasser verdünnt und in gleicher Weise homogenisiert. 200 μL der finalen Lösung wurden auf frisch gespaltenen Glimmer (50-D-10, NanoAndMore, Wetzlar, Deutschland) oder ein Stück Silizium-Wafer (LamResearch Corporation, Freemont, USA) getropft. Die rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden nach 5 min gestartet, um dem Ferritin Zeit zu geben, sich auf der Oberfläche des Substrats abzusetzen. Die Messungen erfolgten dann jedoch an Luft in einem Cypher S Rasterkraftmikroskop (Oxford Instruments, Asylum Research, Santa Barbara, USA). Als *Cantilever* wurde ein Multi75M-G (BudgetSensors, Sofia, Bulgarien) mit einer nominellen Federkonstante von $k=3 \text{ N/m}$ und einer nominellen Resonanzfrequenz an Luft von $f_0=75 \text{ kHz}$ verwendet. Dieser verfügt über eine magnetische Beschichtung aus einer Kobalt-Legierung, die den Spitzenendradius deutlich auf circa 60 nm vergrößert. Der Biegebalken wurde mittels photothermischer Anregung zum Schwingen gebracht. Die Schwingungsamplitude der ersten Eigenfrequenz betrug $A_1=23 \text{ nm}$ und die Schwingungsamplitude der zweiten Eigenfrequenz betrug $A_2=16 \text{ nm}$. Die Messungen erfolgten unter einer Rasterfrequenz von 1 Hz bei einem Amplituden zu Sollwertverhältnis von $A_{\text{soll}}/A_1 = 16 \text{ nm}/23 \text{ nm} = 70 \%$.

5.3. Ergebnisse und Diskussion

Die bimodale amplitudenmodulierte Rasterkraftmikroskopie gibt neben der Topografie der gemessenen Probe weitere physikalische Observablen aus: die Amplituden der ersten und zweiten Eigenmode und die Phase der ersten und zweiten Eigenmode. In **Abbildung 18** sind diese Observablen dargestellt.

Abbildung 18 zeigt die Amplitude der ersten a) und die der zweiten b) Eigenmode, sowie die zugehörige Phasenverschiebung der ersten c) und zweiten d) Eigenmode. Die Topografie der Probe ist in den dreidimensionalen Abbildungsteilen (e und f) dargestellt. Die überlagerte Farbverlaufsdarstellung zeigt die Phasenverschiebung der ersten Eigenmode e) und die der zweiten Eigenmode f). Da eine Spitze mit einer magnetischen Beschichtung (und damit einem größeren Spitzenradius) verwendet wurde, ist der abgebildete Durchmesser des Ferritinnanoteilchens aufgrund des Faltungsartefakts wesentlich größer: sein (scheinbarer) Durchmesser beträgt hier circa 50 nm.

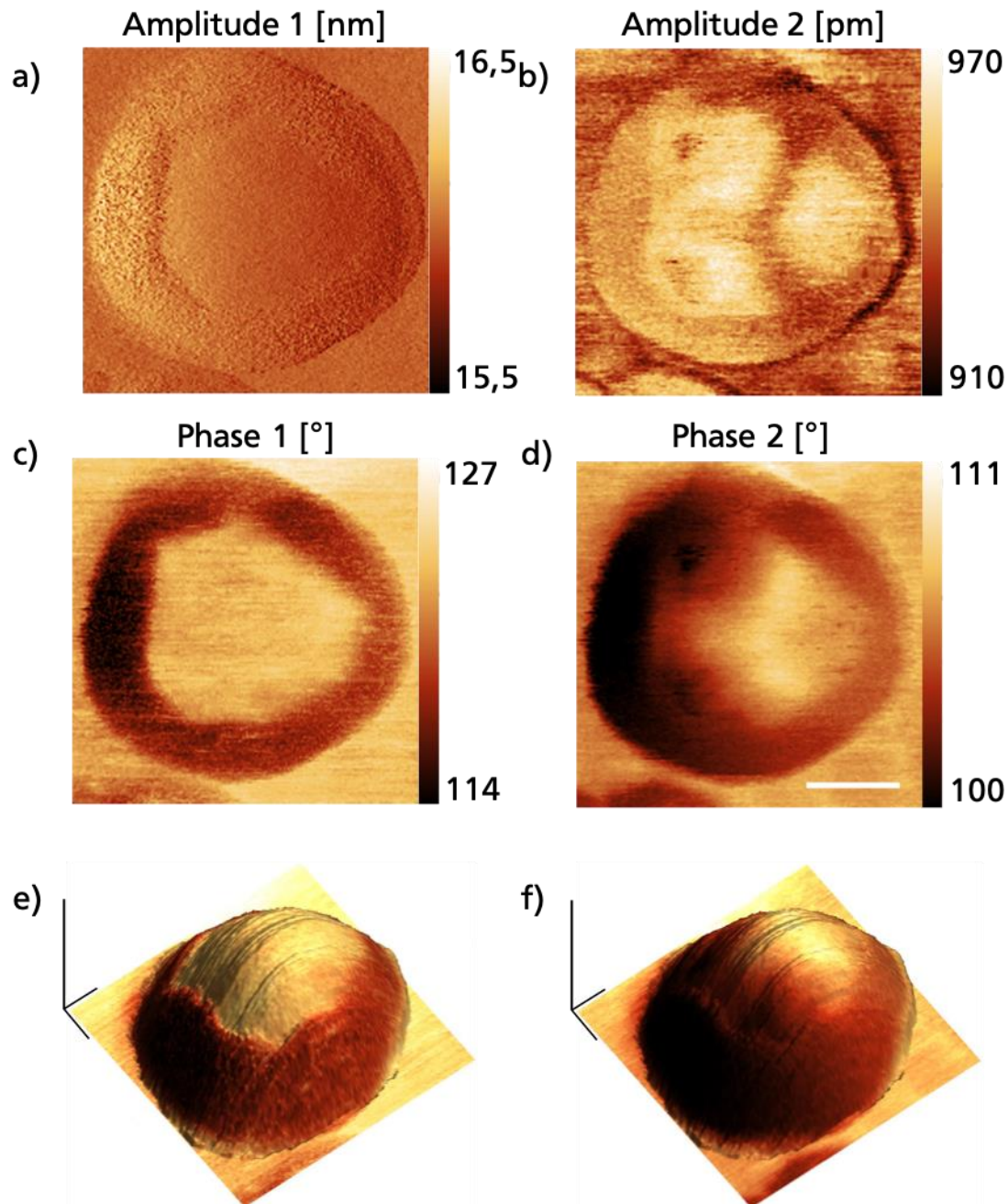


Abbildung 18 Ferritin abgebildet mit bimodaler, magnetischer Rasterkraftmikroskopie. a) bis d) zeigen zweidimensionale Darstellungen verschiedener Observablen, e) und f) eine dreidimensionale Überlagerung von Topografie und Phasensignal. a) zeigt die Amplitude der ersten Eigenmode, b) die der zweiten. c) zeigt die Phase der ersten Eigenmode, d) die der zweiten. In e) ist die Topografie dreidimensional repräsentiert und als Farbcode die Phase der ersten Schwingung überlagert, in f) die der zweiten Schwingung. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 10 nm.

Der Kern des Ferritins zeigt superparamagnetische Eigenschaften, das heißt er lässt sich in einem magnetischen Feld polarisieren baut selber ein magnetisches Feld auf, verliert dieses aber wieder, wenn das äußere Feld wegfällt. Eine solche Magnetisierung kann zum Beispiel durch die magnetische Spitze des Biegebalkens erfolgen und die Struktur

des Kerns innerhalb der Proteinhülle, in der Darstellung der langreichweitigen Wechselwirkungen sichtbar werden. Die Abbildungen der Amplitude a) und der Phasenverschiebung c) der ersten Eigenmode zeigen einen Ring um eine zentrale Fläche, die relativ konstante Amplituden- und Phasenwerte aufweisen. Insbesondere in der Abbildung der Phasenverschiebung c) ist deutlich, dass der innere Bereich nicht kreisförmig abgetrennt ist, sondern durch verschiedene Geraden die sich in unterschiedlichen Winkeln schneiden und eine polygone Figur formen. Betrachtet man den Ring in a) genauer, so fällt auf, dass dieser an der linken Seite heller abgebildet ist, als an der rechten Seite. Die Amplitude ist also auf beiden Seiten nicht gleich groß. So verhält es sich auch mit der Phasenverschiebung in c). Das deutet darauf hin, dass die Regelung nicht ganz optimal funktioniert und einen kleinen Fehler zugelassen hat. Beide Abbildungen der Observablen der zweiten Eigenmode (b und d) zeigen eine dreizählige Symmetrie im inneren Bereich des Ferritins. Eine genauere Analyse der polygonen Figur und der dreizähligen Symmetrie erfolgt mit Hilfe der folgenden Abbildung.

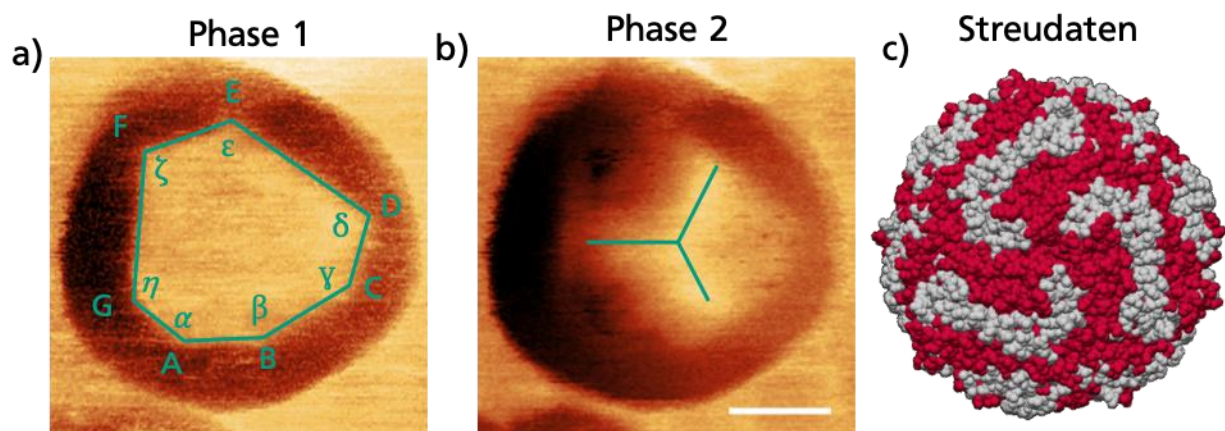


Abbildung 19 Bimodale magnetische Rasterkraftmikroskopie an einem einzelnen Ferritin Nanoteilchen. Die Detailabbildungen zeigen: a) die Phasenverschiebung der ersten Schwingung, eine polygone Figur aus dem Inneren des Teilchens, b) die Phasenverschiebung der zweiten Schwingung, eine dreizählige Symmetrie der Hülle des Teilchens, c) die Rekonstruktion der Hülle des Teilchens aus Röntgenstreudaten [109], die ebenso eine dreizählige Symmetrie aufweist.


Die Winkel zwischen den Ecken des inneren Polygons können aus a) abgelesen werden: $\alpha = 126^\circ$, $\beta = 150^\circ$, $\gamma = 142^\circ$, $\delta = 105^\circ$, $\epsilon = 126^\circ$, $\zeta = 114^\circ$ und $\eta = 138^\circ$. Aufgrund der Variation und fehlenden Regelmäßigkeit zwischen den Winkeln kann davon ausgegan-

gen werden, dass das Ferrihydrit in einem polykristallinen Zustand als Kern kondensiert. In b) wird die dreizählige Symmetrie der Hülle verdeutlicht, die in der Amplitude der Schwingung der zweiten Eigenmode sichtbar ist. Diese ist in guter Übereinstimmung mit der dreizähligen Symmetrie, die man aus bestehenden röntgenografischen Daten [109] und Rekonstruktion der Molekülanordnung [110] erhalten kann c). Dadurch, dass der magnetische Biegebalken mit zwei Eigenfrequenzen gleichzeitig zum Schwingen angeregt wird, ist die Detektion von magnetischen und mechanischen Eigenschaften in einem einzigen Schritt möglich. Je nach Wahl der experimentellen Parameter (A_1 , A_2 , A_1/A_2 und A_{soll}/A_1) sind die Observablen der ersten oder der zweiten Eigenmode von den magnetischen oder den mechanischen Kräften dominiert. Das bedeutet, dass die polygone Struktur a) und die dreizählige Symmetrie das Ergebnis eines magnetomechanischen Kontrasts sind. Um sensitiv in Bezug auf magnetische Wechselwirkungen zu sein, wurde hier eine relativ große Amplitude für die erste Eigenmode gewählt. Die Amplitude der zweiten Eigenmode wurde kleiner eingestellt, als die der ersten, aber immer noch groß genug, um einen deutlichen mechanischen Kontrast zwischen Spitze und Probe zu erzwingen. Als Ergebnis erhält man in nur einer Messung aus dem magnetischen Kontrast der ersten Eigenmode ein Abbild des polykristallinen Zustands des Ferritinkerns und aus dem mechanischen Kontrast der zweiten Eigenmode ein Abbild der dreizähligen Symmetrie der Proteinhülle. Das zeigt auch, dass die Proteinhülle trotz der Messung an Luft noch intakt war.

Wie sich die Proteinhülle in Bezug auf unterschiedliche Umgebungseinflüsse verhält, kann ebenfalls mit Rasterkraftmikroskopie untersucht werden und ist Bestandteil von Kapitel 6.

5.4. Zusammenfassung

Mit bimodaler, magnetischer Rasterkraftmikroskopie wurde ein einzelnes Ferritin Nanoteilchen abgebildet. Ferritin ist ein im menschlichen Körper vorkommendes Eisenspeicher-Protein, das aus einer Proteinhülle und einem Kern aus Ferrihydrit besteht. Mit dieser Abbildungsmethode ist es möglich, Kern und Hülle separat voneinander darzustellen, obwohl der Kern in der Hülle verborgen ist. Zu Nutze macht man sich hier die unterschiedlichen Wechselwirkungslängen der topografieerzeugenden Kräfte der



Hülle und der magnetischen Wechselwirkungen des Kerns. So kann der Kern im polykristallinen Zustand identifiziert und die dreizählige Symmetrie der Proteinhülle bestätigt werden.

6. Quasistatische Rasterkraftmikroskopie: selbstorganisierter Ab- und Aufbau der Ferritinhülle

Dieser Abschnitt soll die grundlegende Möglichkeit der Kraft-Abstandskurvenbasierten, quasistatischen Rasterkraftmikroskopie deutlich machen: das sensitive Abbilden der Topografie einer Oberfläche von Biomolekülen.

Hier wird die Methode des „PeakForce Tapping“ verwendet (siehe auch Kapitel 2.5) um das Verhalten von Ferritin und kernlosem Ferritin, dem Apoferritin, unter unterschiedlichen pH-Werten zu untersuchen. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind ebenfalls in der Veröffentlichung [35] zu finden.

6.1. Einführung

Wie auch andere Proteine, kann die leere Hülle des Ferritins, das „Apoferritin“, genutzt werden, um verschiedene Substanzen damit zu transportieren. Das kann zum Beispiel in medizinischen Anwendungen genutzt werden [111-114]. Auch ist es möglich, Nanomaterialien im Inneren des Apoferritin herzustellen [115]. Es ist bekannt, dass die Proteinhülle einen selbstorganisierten Auf- und Abbau zeigt, der vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig ist [116]: die Proteinhülle ist im sauren Medium stabil bis zu einem pH-Wert von circa $\geq 3,4$, der Kern bis zu einem pH-Wert von $\geq 2,1$ [117]. Unterhalb eines pH-Werts von 3 beginnt der Abbau der Hülle. Dieser Prozess ist umkehrbar, wenn der pH-Wert der Umgebung wieder erhöht wird. Genau diese Eigenschaft kann genutzt werden, um andere Stoffe in die Proteinhülle einzukapseln und auch wieder frei zu geben. Auch, wenn dieses Einkapseln zufällig und nicht gerichtet erfolgt, ist Ferritin damit ein hervorragender Kandidat zum Transport von Stoffen in Organismen.

Der Ab- und Aufbau der Proteinhülle wurde bereits mit verschiedenen Methoden untersucht: mittels Röntgenkleinwinkelstreuung konnten die pH-Wertbereiche für den Ab- und Aufbau genau festgelegt werden [117]. Allerdings sind solche Messungen keine direkte Beobachtung dieses Vorgangs – die Schlussfolgerung wird hier durch schrittweise Transformation der Messdaten gezogen: Streumethoden erzeugen Abbildungen im reziproken Raum, die dann mittels Simulationen oder „Modellfits“ in den Realraum übertragen werden müssen. Zudem stellen sie immer ein Mittel über viele Objekte dar.

Mittels Rasterkraftmikroskopie kann der Ab- und Aufbauvorgang jedoch nicht nur direkt im Realraum dargestellt, sondern auch an einzeln herausgegriffenen Teilchen beobachtet werden. Im Folgenden sollen zusätzlich auch die elektrosterischen Wechselwirkungen zwischen Spitze des Biegebalkens und der Ferritinhülle untersucht werden, um die gemessenen Höhenänderungen der Proteinhülle richtig einschätzen zu können.

6.2. Experimentelles

Die Herstellung der Proben, sowie die Auswertung der gemessenen Daten wird im Folgenden beschrieben.

6.2.1. Herstellung der Proben

Die Herstellung der Ferritin-Proben erfolgte wie in 5.2 beschrieben. Die Herstellung der Proben aus Apoferritin erfolgte in gleicher Weise, jedoch wurde als Vorratslösung Apoferritin (aus der Pferdemilz, in 50 % Glycerol + 0,075 M NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

6.2.2. Größenanalyse mittels Rasterkraftmikroskopie

Für die Größenanalyse der Nanoteilchen wurden rasterkraftmikroskopische Messungen im „PeakForce Tapping“ Modus durchgeführt. Dafür wurde ein Bruker „ICON“ Rasterkraftmikroskop mit einer geschlossenen, heizbaren Elektrochemiezelle verwendet (DIM EC cell, Bruker, Santa Barbara, USA). Abbildungen der Topografie der Nanoteilchen wurden bei einer Oszillationsamplitude des Biegebalkens von 300 nm und einer Anregungsfrequenz von 500 Hz erstellt. Als Führungsgröße für die Regelung wurde eine Kraft von 500 pN eingestellt. Die verwendeten Biegebalken waren „SNL-A“ (Bruker, Santa Barbara, USA), mit einer typischen Federkonstante von $k \approx 0,35 \text{ N/m}$ und einer typischen Resonanzfrequenz an Luft von 65 kHz. Bei einer Abbildungsgröße von $1 \times 1 \mu\text{m}$ und 256 Pixeln beträgt die laterale Auflösung circa 4 nm.

Die Abbildungen der Topografie wurden ebenenkorrigiert, um eine Schiefelage des Substrats auszugleichen. Durch die interne Heizung der Messzelle wurde die Temperatur konstant bei 37 °C gehalten. Um den pH-Wert der umgebenden Lösung einzustellen wurde entweder Salzsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) oder

Ammoniak (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in das deionisierte Wasser gegeben, bis der gewünschte pH-Wert eingestellt war. Diese Lösungen wurden in Spritzen, in einem Wasserbad, auf 37 °C vorgeheizt und dann mit Hilfe einer Spritzenpumpe (Aladdin-1000, World Precision Instruments, Sarasota, USA) bei konstanter Flussgeschwindigkeit in die Messzelle gegeben, wobei gleichzeitig die dort vorhandene alte Lösung auslaufen konnte. Der pH-Wert der auslaufenden Lösung wurde ständig kontrolliert. Hatte dieser den Wert der aktuell einfließenden Lösung erreicht, so wurde angenommen, dass dieser Wert für die ganze Messzelle gilt und die Flüssigkeit im Inneren komplett ausgetauscht worden ist.

Zur Auswertung wurden die Höhen der Ferritin- und Apoferritinteilchen bestimmt, indem drei Querschnitte über jedes Teilchen gelegt und jeweils die mittlere Höhe bestimmt wurde. Da die Proben mit Apoferritin eine deutlich größere Dichte an Teilchen aufwiesen, wurde hier ein automatisiertes Verfahren zur Partikelbestimmung verwendet, um die Höhenverteilungen zu bestimmen [118].

6.3. Ergebnisse und Diskussion

Die Auswertung bezieht sich zum einen auf den Einfluss elektrosterischer Wechselwirkungen zwischen Messspitze, Proteinhülle und Substrat auf die ausgewerteten Höhen der Nanoteilchen. Zum anderen wird die Entwicklung der Höhenverteilung von Ferritin und Apoferritin bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht.

6.3.1. Elektrosterische Wechselwirkungen

Der Isoelektrische Punkt ist der pH-Wert einer Lösung, an dem die Oberfläche eines in der Lösung eingetauchten Materials oder Moleküls keine Nettoladung trägt. Die folgende Abbildung zeigt schematisch das Vorzeichen der Nettoladung von Siliziumdioxid [119], Glimmer [120] und Apoferritin [121], jeweils in Abhängigkeit des pH-Werts. Die dadurch entstehenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Spitze des Biegebalkens, der Proteinhülle und dem Substrat sind darunter verdeutlicht.

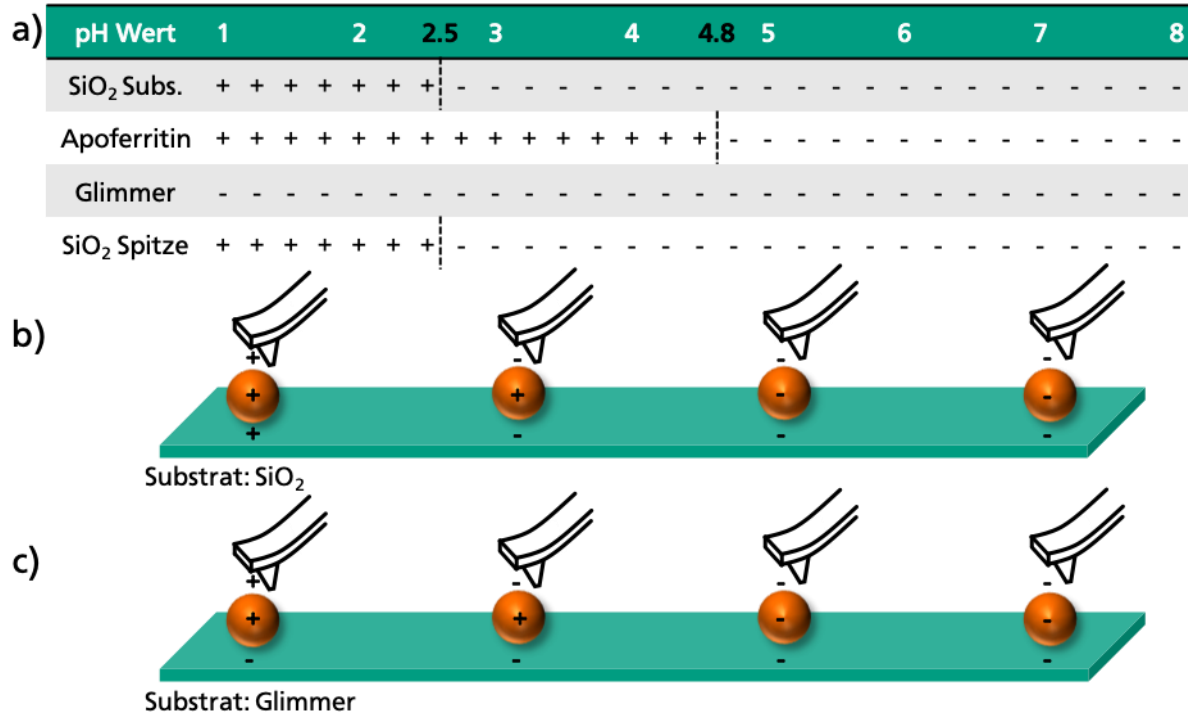


Abbildung 20 Elektrosterische Wechselwirkungen zwischen Messspitze, Ferritin-Nanoteilchen und Substrat bei verschiedenen pH-Werten.

Aus **Abbildung 20** können wir erkennen, dass eine Anziehung zwischen der Proteinhülle des Ferritins und dem Siliziumsubstrat in wässriger Lösung bei pH-Werten zwischen 2,5 und 4,8 vorherrscht. Ist das Substrat eine Glimmeroberfläche, so reichen die anziehenden Kräfte bis in ein stark saureres Milieu hinein. In diesen pH-Bereichen sollte die Bewegung der Nanoteilchen auf dem Substrat gehindert sein, sie werden auf der Oberfläche immobilisiert. In diesem pH-Bereich ist auch die Wechselwirkung zwischen der Spitze des Biegebalkens und der Proteinhülle anziehend, außerhalb davon abstoßend. Diese anziehende Kraft führt zu einem Unterschätzen der Größe der Nanoteilchen, da der Regelkreis die anziehende Wechselwirkung ausgleichen muss um den Kraftsollwert zu erreichen. Umgekehrt führt dieser Effekt dazu, dass außerhalb dieses pH-Bereichs die Größe der Nanoteilchen überschätzt wird. Bei der Auswertung der Veränderung der Größen der Teilchen muss dies mit in die Überlegungen einbezogen werden.

6.3.2. Auswirkung des pH-Werts auf die Größenverteilung von Ferritin

Um die Auswirkungen der Veränderung des pH-Wertes auf die gemessene Größe der Proteinhülle zu untersuchen, wurde dieselbe Stelle der mit Ferritinnanoteilchen bedeckten Oberfläche mehrmals gemessen, während der pH-Wert der umgebenden Lösung geändert wurde. **Abbildung 21** zeigt beispielhaft eine solche Messreihe.

In der folgenden Weise wurde der pH-Wert in der in **Abbildung 21** dargestellten Messreihe geändert: pH 6 a), pH 2 b), pH 4 c), pH 6 d), pH 8 e), pH 2 f), pH 4 g), pH 6 h). Erwartungsgemäß sollte sich die Proteinhülle der Nanoteilchen zunächst abbauen b), dann wieder aufbauen e) und sich dann der Vorgang wiederholen (f-h).

Die Ferritinnanoteilchen sind homogen auf der Oberfläche des Substrats verteilt, einzelne Nanoteilchen können klar identifiziert werden. Auffallend ist, dass sie in Form und Größe sichtbar variieren. Nanoteilchen, die im nächsten Schritt verschwinden sind mit einem Quadrat markiert. In diesem Fall wird die Proteinhülle komplett abgebaut und auch der Kern zersetzt. Mit einem Kreis markiert sind Nanoteilchen, die über den gesamten Ablauf des Experiments sichtbar bleiben, aber ihre Höhe ändern. Pfeile zeigen auf Nanoteilchen, die in diesem Schritt neu gebildet wurden. Im ersten Schritt der Veränderung des pH-Werts, von pH 6 (a) zu pH 2 (b), nimmt die Größe der mit einem Kreis markierten Nanoteilchen ab. Das oberste Partikel verändert seine Größe von 9 nm zu 6 nm. Diese endgültige Größe passt gut zur Größe des Eisenhydroxidkerns. Die mit einem Quadrat markierten Nanoteilchen sind im zweiten Schritt nicht mehr sichtbar. Im weiteren Verlauf des Experiments wird der pH-Wert schrittweise erhöht, bis der pH-Wert 8 erreicht wurde (e). Die Größe der mit einem Kreis markierten Teilchen wächst, und erreicht in einem Fall einen etwas größeren, als den ursprünglich gemessenen Wert (initiale Größe 9 nm, Endgröße 13 nm). Im Verlauf von (c) bis hin zu (e) entstehen verschiedene neue Nanoteilchen, diese werden durch Pfeile angedeutet. Im letzten Abschnitt dieses Experiments wird der pH-Wert wieder auf pH 2 verringert und ein letztes Mal auf pH 8 erhöht. Auch jetzt zeigt sich das typische Verhalten der Nanoteilchen: der saure pH-Wert von 2 führt zu einer geringeren Höhe und Anzahl der Teilchen, wird der pH-Wert wieder auf 8 erhöht, bilden sich neue Teilchen und die Höhe der bestehenden Teilchen nimmt zu.

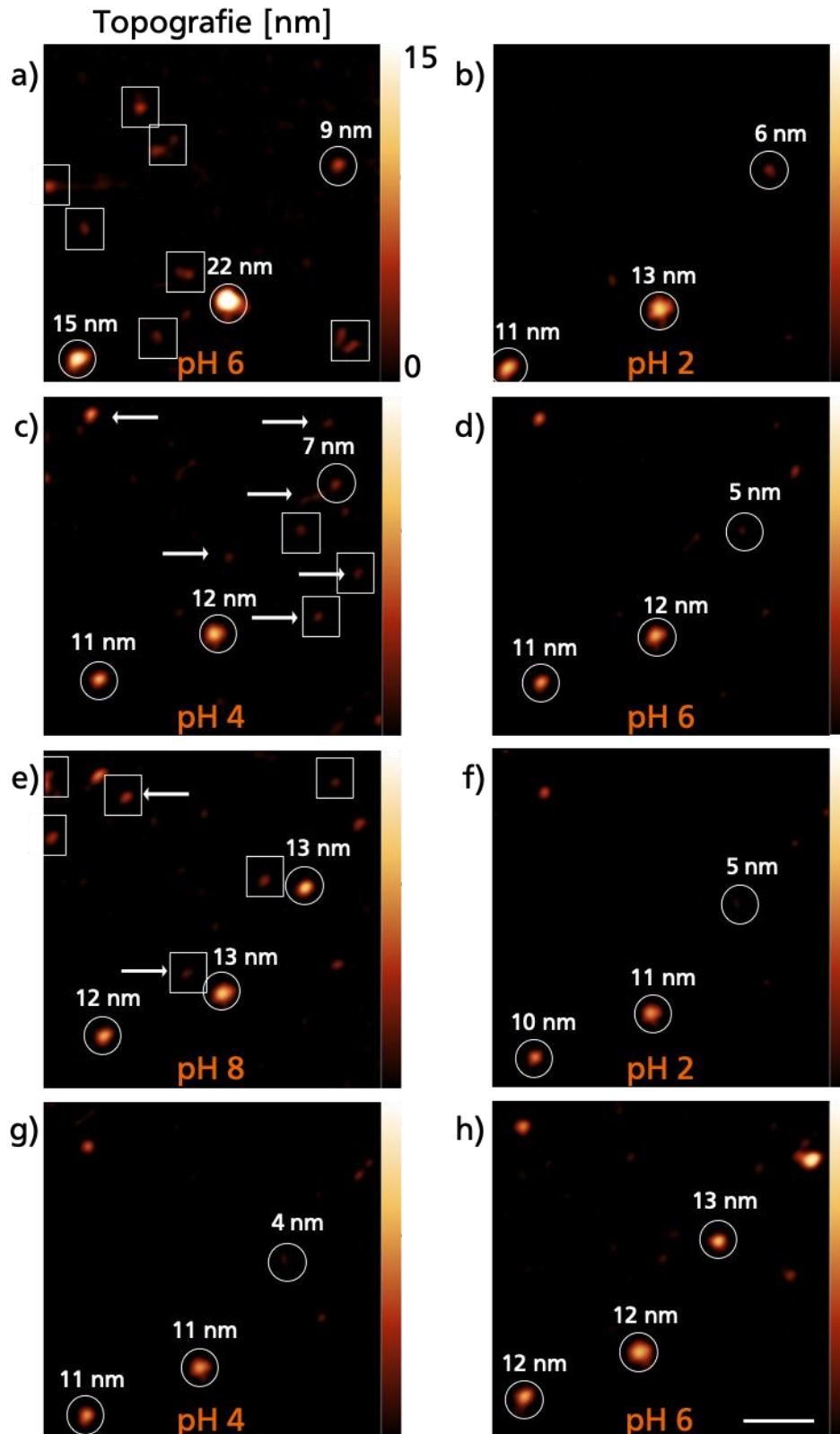


Abbildung 21 Topografie einer Probe mit Ferritinnanoteilchen auf einem Glimmer-Substrat in wässriger Umgebung bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Abfolge der eingestellten pH-Werte (und damit auch die zeitliche Abfolge der Messung) ist: a) pH 6, b) pH 2, c) pH 4, d) pH 6, e) pH 8, f) pH 2, g) pH 4 und h) pH 6. Die Nanopartikel sind unterschiedlich gekennzeichnet: Quadrat = verschwindet im nächsten Schritt, Pfeil = neu entstanden und Kreis = während des ganzen Experiments präsent, die unterschiedlichen Größen sind angegeben. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 100 nm.

Dieses Verhalten lässt sich auch für die kernlosen Apoferritinnanoteilchen zeigen. In gleicher Weise, wie bei den Ferritinnanoteilchen wurde der umgebende pH-Wert für die Apoferritinnanoteilchen verändert und deren Größe gemessen. Eine solche Messreihe ist in **Abbildung 22** dargestellt.

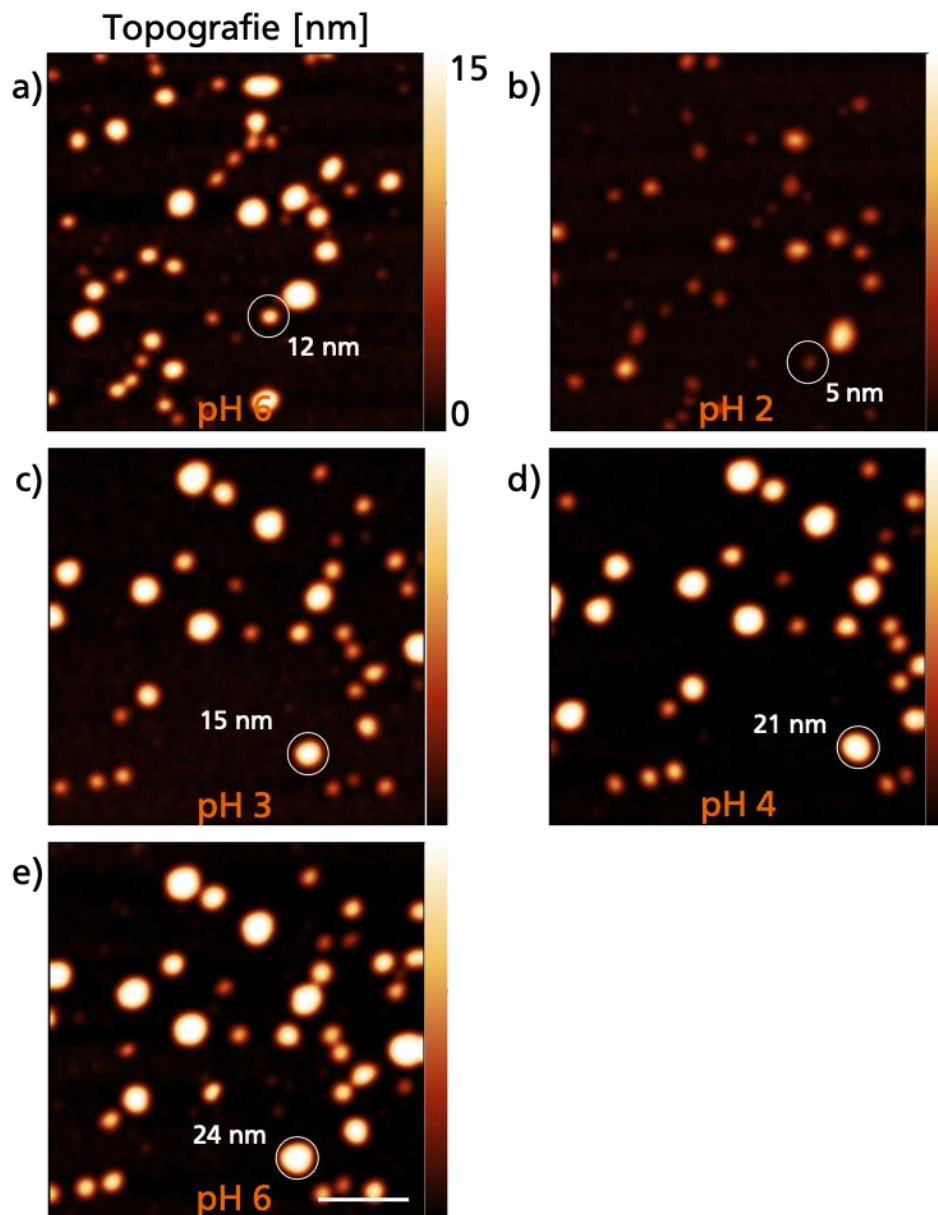


Abbildung 22 Topografie einer Probe mit Apoferritinnanoteilchen auf einem Glimmer-Substrat in wässriger Umgebung bei unterschiedlichen pH-Werten. Ein Teilchen ist herausgegriffen und durch einen weißen Kreis markiert. Seine Höhe im jeweiligen Abschnitt des Experiments ist angegeben. Die Abfolge der pH-Werte (und damit auch die zeitliche Abfolge der Messung) ist: a) pH 6, b) pH 2, c) pH 3, d) pH 4 und e) pH 6. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 200 nm.

Auffallend ist, dass sowohl die Dichte an Teilchen pro Oberfläche, als auch die Größenverteilung der Teilchen größer ist, als bei den Ferritin-Proben. Der pH-Wert der umgebenden Lösung wurde in der folgenden Abfolge verändert: pH 6, pH 2, pH 3, pH 4 und pH 6. In jedem Schritt verändert sich die Größe der Nanoteilchen. Ein beispielhaft herausgegriffenes Teilchen hat eine initiale Größe von 12 nm und verringert diese im sauren pH-Wert auf circa 5 nm. Wird der pH-Wert wieder bis auf pH 6 erhöht, so vergrößert sich sein Durchmesser bis auf 24 nm und ist damit größer, als der initiale Wert. Da nicht nur die Anzahl an Nanoteilchen auf der Oberfläche größer ist, sondern auch deren Positionsänderung im Verlauf des Experiments, wurde eine statistische Auswertung gewählt und nicht einzelne Teilchen verfolgt. Die Größenverteilungen in Bezug auf den jeweiligen pH-Wert im Verlauf der Messung sind in **Abbildung 23** als dargestellt

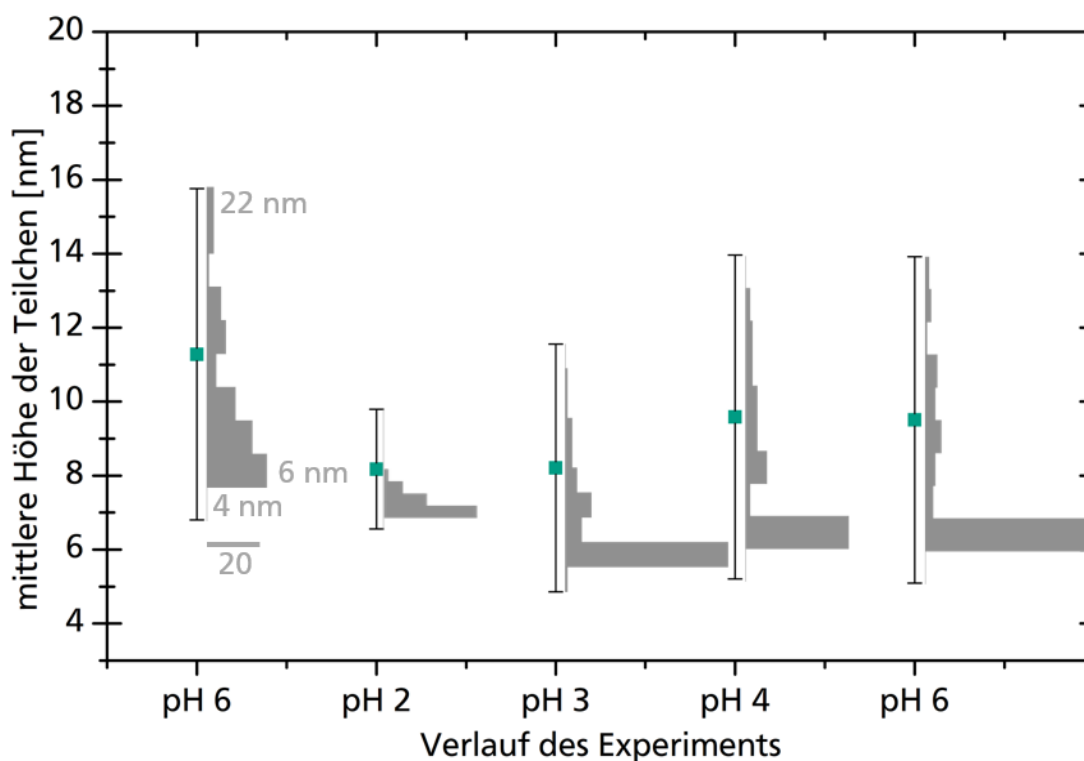


Abbildung 23 Entwicklung der Höhenverteilung der Apoferritin Nanoteilchen aus **Abbildung 22**. Für jeden Schritt der Messreihe ist die mittlere Höhe der Teilchen angegeben, sowie die Standardabweichung der Verteilung. Zusätzlich zeigt ein Histogramm die Höhenverteilung der Teilchen in jedem Schritt des Experiments.

Grundsätzlich verringert sich die Größe der Apoferritinnanoteilchen, wenn der pH-Wert vermindert wird. Das ist sowohl in **Abbildung 22 b)** an der dunkleren Farbgebung der Nanoteilchen erkennbar, kann aber auch aus der zweiten mittleren Höhe in **Abbildung**

23 gelesen werden: die mittlere Höhe sinkt vom ersten zum zweiten Schritt des Experiments von circa 11 nm auf circa 8 nm ab. Gleichzeitig nimmt auch die Standardabweichung ab, von circa 10 nm auf circa 7 nm. Das anschließende, schrittweise Erhöhen des pH-Werts lässt die mittlere Größe kaum wachsen. Die Standardabweichung nimmt jedoch sehr wohl zu, von circa 4 nm auf circa 8 nm. Am Ende der Messreihe hat die mittlere Größe einen Wert von circa 10 nm und damit fast den initialen Wert erreicht.

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass je saurer der pH-Wert der umgebenden Lösung ist, desto niedriger ist die mittlere Größe der Ferritin- oder Apoferritinnanoteilchen. Gemein ist beiden Teilchen auch, dass ein anschließendes Erhöhen des pH-Werts die Teilchen wachsen lässt. Diese Beobachtungen sollten keine Artefakte elektrosterischen Ursprungs sein (siehe Kapitel 6.3.1), da in dem pH-Wertbereich, in dem die Nanoteilchen eine geringe Größe haben, diese Größe auch noch überschätzt wird. Durch die abstoßende elektrostatische Wechselwirkung zwischen Messspitze und Apoferritin bei einem pH Wert von 2, wird die „Peak Force“ und damit das Ende der Kraft-Abstands Kurve früher erreicht und die gemessene Höhe erscheint größer, als dies bei anziehenden Kräften der Fall wäre. Interessanter Weise lassen sich auch neu entstandene Nanoteilchen finden, an Plätzen, an denen zuvor kein Teilchen gelagert war. Diese entstehen vermutlich aus Proteinfragmenten, die sich in der Umgebung befinden und Reste von vorher abgebauten Nanoteilchen sind. Vereinzelt werden Teilchenhöhen gemessen, die deutlich größer sind, als der typische Durchmesser eines Apoferritin Nanoteilchens. Das kann damit erklärt werden, dass sich mehrere Nanoteilchen zu Agglomeraten zusammenlagern können und nicht mehr als unterschiedliche Teilchen identifiziert werden und so als ein großes Nanoteilchen erscheinen.

6.4. Zusammenfassung

Der pH-Wertabhängige Ab- und der Aufbau der Proteinhülle von Ferritin und Apoferritin wurde *in situ* mit einem Rasterkraftmikroskop untersucht. Dazu wurde in einer geschlossenen Messzelle der umgebende pH-Wert variiert und kontinuierlich Kraft-Abstands Kurvenbasierte rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Topografie der Nanopartikel erstellt. Die Veränderung der Höhe dieser Teilchen ist ein Maß für den Ab- und den Aufbau der Proteinhülle. Je saurer die Umgebung, desto niedriger die Nanopartikel und desto stärker ist die Proteinhülle abgebaut. Wird der pH-Wert der Umgebung wieder in einen basischen Bereich zurückgebracht, so vergrößert sich auch wieder die Höhe

der Teilchen. Die Proteinhülle baut sich also wieder auf. Es konnte auch das Entstehen von neuen Nanoteilchen beobachtet werden.

Kraft-Abstandskurven-basierte Rasterkraftmikroskopie eignet sich gut, um Topografieabbildungen in der flüssigen Umgebung einer geschlossenen Messzelle durchzuführen. Jedoch ist die Auflösung in diesem Fall nicht hoch genug, um einzelne Strukturen der Proteinhülle der Nanopartikel unterscheiden zu können.

7. Untersuchung lebender menschlicher Zellen mit quasistatischer Rasterkraftmikroskopie

In Kapitel 6 konnte gezeigt werden, dass quasistatische Rasterkraftmikroskopie gut geeignet ist, um die Topografie von Nanoteilchen auf einer glatten Oberfläche schnell und mit Nanometer-Genauigkeit abzubilden. Im Folgenden sollen lebende, menschliche Zellen mit derselben Methode abgebildet werden. Im Unterschied zu den kleinen, kompakten Nanoteilchen, sind lebende menschliche Zellen vergleichsweise große und sehr weiche Objekte. Zusätzlich dazu müssen die Zellen in ihrer Nährlösung gemessen werden, um sie am Leben zu halten. Die Messparameter müssen folglich angepasst werden, im Vergleich zu denen in Kapitel 6.

Der Fokus der Auswertung lag auf der Struktur der Topografie der Zellen und dem Vergleich des Aussehens zweier unterschiedlicher Zelllinien. Die beiden Zelllinien unterschieden sich dadurch, dass es sich bei der einen Linie um gesunde Zellen und bei der anderen Linie um von Krebs befallene Zellen handelte. Beides jedoch waren menschliche Epithelzellen der Brust.

7.1. Experimentelles

Die folgenden Parameter für die Zellkultur und die rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden angewandt.

7.1.1. Zellkultur

Zwei unterschiedliche Zelllinien wurden kultiviert, um anschließend vergleichende Messungen der beiden Kulturen im Rasterkraftmikroskop durchführen zu können. Bei der einen Zelllinie, „HBL-100“ handelte es sich um gesunde, menschliche Epithelzellen aus der weiblichen Brustdrüse. Die andere Zelllinie, „BT-20“, stammt aus einem Krebstumor, ebenfalls aus dem weiblichen Brustdrüsengewebe. Beide Linien wurden von „CLS GmbH“ (Eppelheim, Deutschland) bezogen. Als Zellkulturmedium diente eine Lösung aus *Dulbecco's modified Eagle's medium* DMEM (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), zusammen mit 10 % fötalem Kälberserum (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 1 % Penicillin und Streptomycin (Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als Antibiotikum. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung

(Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert und auf Glasobjektträger gegeben. Die Objektträger wurden in einem vorherigen Schritt plasmabehandelt, um ein besseres Anhaften der Zellen auf der Oberfläche zu ermöglichen. Vor der Messung wurden die Zellen mehrere Male mit dem Nährmedium gefüttert und mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gewaschen. Die Messungen im Rasterkraftmikroskop fanden statt, als die Zellen Konfluenz (das heißt vollständige Bedeckung) auf dem Objektträger erreicht hatten.

7.1.2. Rasterkraftmikroskopie

Die rasterkraftmikroskopischen Messungen wurden mit einem Bruker „ICON“ Rasterkraftmikroskop im „Peak Force Tapping“ Modus durchgeführt (siehe Kapitel 2.5, der selbe Modus, wie in Kapitel 6), also einer quasistatischen, auf Kraft-Abstandskurven basierenden Methode. Sehr weiche Biegebalken mit dreieckiger Form und zwei Stegen aus Siliziumnitrid wurden dafür verwendet: Bruker „MLCT-BIO-DC_C“, mit einer nominalen Federkonstante von 0,01 N/m. Die Messspitze hat die Form einer vierseitigen Pyramide mit einem Endradius von 20 nm und einem Öffnungswinkel der Seiten von 40°. Für die Messungen wurde das Nährmedium gewechselt und ein CO₂-unabhängiges *L-15 Medium* (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Mit einer Scanrate von 0,1 Hz für eine Zeile wurden auf einer Fläche von $93 \times 93 \mu\text{m}^2$, 1024 x 1024 Datenpunkte aufgezeichnet. Daraus ergibt sich eine Auflösung von circa 90 nm pro Datenpunkt, was größer als der Durchmesser des Endes der Messspitze ist. Als Sollwert der Kraft (und damit Regelgröße) wurden 150 pN festgelegt. Die Amplitude der Oszillation betrug 300 nm, die Schwingungsfrequenz 250 Hz, deutlich unterhalb der Resonanzfrequenz für die vertikale Oszillation des Biegebalkens.

7.2. Ergebnisse und Diskussion

Aus den gemessenen Daten lässt sich recht einfach die Topografie der Probenoberfläche rekonstruieren: in diesem Fall entspricht der Höhenwert in der Topografie der z-Position am Ende der Kraft-Abstands Kurve. Jeder Mess-Punkt wird mehrmals gemessen und nach jeder Kurve die z-Position der Rastereinheit so geregelt, dass am Ende der

Kraft-Abstands Kurve die Soll-Kraft erreicht wird. Weicht die in diesem Moment wirkende Kraft auf die Messspitze vom Sollwert ab, so kann dies als Regelfehler dargestellt werden. Die Darstellung des Regelfehlers eignet sich besonders dazu, Änderungen in der Topografie sichtbar zu machen. Praktisch betrachtet handelt es sich um die Ableitung der Topografie. Hier ist der Regelfehler die Abweichung zwischen Führungs- und Regelgröße am Ende der Kraft-Abstands Kurve.

In **Abbildung 24** ist jeweils ein Ausschnitt der Probe der BT-20 Krebszellen (a und b) und ein Ausschnitt der Probe der gesunden HBL-100 Zellen (c und d) dargestellt. Die Topografie ist mit farbiger Höenskala in a) und c) zu erkennen, der Regelfehler mit Grauwertskala in b) und d).

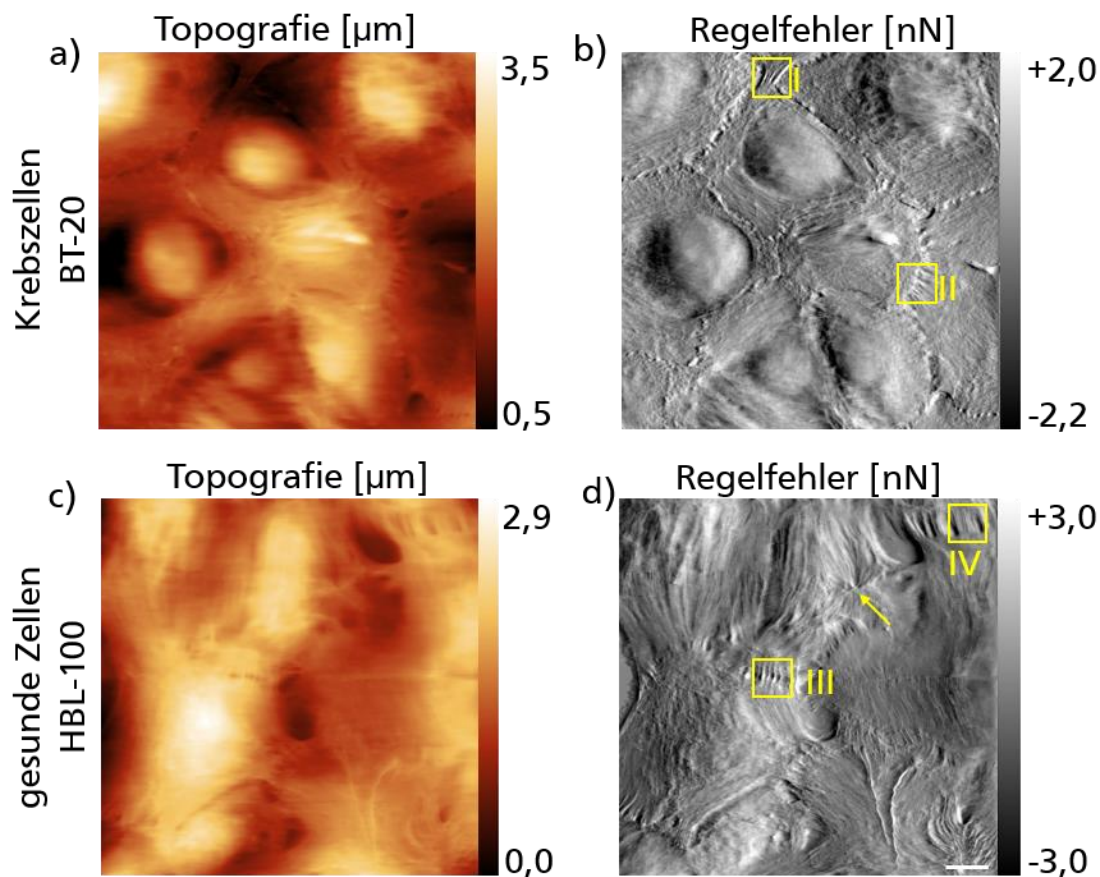


Abbildung 24 Lebende, menschliche Zellen, abgebildet mit quasistatischer Rasterkraftmikroskopie. In a) und b) ist ein Ausschnitt einer Probe mit BT-20 Krebszellen abgebildet, in c) und d) ist ein Ausschnitt einer Probe mit gesunden HBL-100 Zellen dargestellt. Die Topografie wird jeweils in a) und c) dargestellt, der Regelfehler in b) und in d). Die Länge des Skalenbalkens beträgt 10 µm. Die gelben Vierecke sind mit römischen Ziffern bezeichnet und beziehen sich auf vergrößerte Darstellungen in **Abbildung 25**. Der gelbe Pfeil markiert die Position einer vergrößerten Darstellung in **Abbildung 26**.

In beiden Abbildungen der Topografie sind mehrere, dicht beieinanderliegende Zellen zu erkennen. Sie sind von unterschiedlicher und unregelmäßiger Form. Die Krebszellen sind klarer voneinander abgetrennt, als die gesunden Zellen. Die Zellkerne treten als kompaktere, ovale Objekte hervor und sind insbesondere in [Abbildung 24 a\)](#) gut zu erkennen. Schon in den Topografieabbildungen ist ein faserartiges Netzwerk zu sehen, dass sich über die Zellen und teilweise auch über die Zellkerne erstreckt und die einzelnen Zellen untereinander zu verbinden scheint. In der Darstellung des Regelfehlers, [Abbildung 24 b\)](#) und d), wird dieses Netzwerk noch deutlicher sichtbar. Insbesondere parallele Anordnungen der faserartigen Struktur sind auffallend. Ebenso ist auffallend, dass die Zellkerne der gesunden Zellkultur (d) von diesem faserartigen Netzwerk bedeckt werden, die Krebszellen (b) jedoch eine wesentlich glattere Oberfläche der Zellkerne aufweisen. Die Zellkerne der Krebszellen sind rundlicher geformt, als die der gesunden Zellen, die eher als längliche Ovale hervortreten. Auch ist die Größe der Zellkerne im Verhältnis zur Gesamtfläche der Zelle bei den Krebszellen größer. Einige besondere Stellen des faserartigen Netzwerks sind exemplarisch herausgegriffen und einzeln, vergrößert in [Abbildung 25](#) dargestellt.

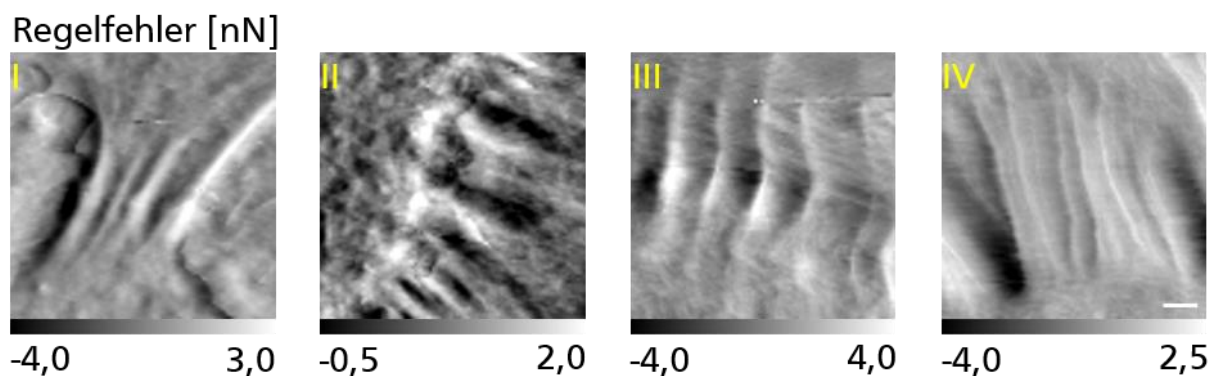


Abbildung 25 Detailausschnitte aus [Abbildung 24](#). Die Ziffern I bis IV markieren in [Abbildung 24](#) die Positionen des jeweiligen Ausschnitts. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 μm .

Dieses parallele faserartige Netzwerk tritt in den Bereichen zwischen zwei Zellen auf. Die Abstände zwischen solchen Fasern betragen hier zwischen circa 0,3 μm und 1,2 μm . Das Zellskelett besteht im Wesentlichen aus drei Bestandteilen: den Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli. Da die Größe eines Datenpunktes in diesen Messungen 90 nm beträgt, handelt es sich bei diesen Strukturen wahrscheinlich im Bündel aus nahe zusammenliegenden Fasern wie Aktinfilamenten, die durch das

Protein Fascin gebunden sein können. Auch weisen solche Bündel eine entsprechende Biegefestigkeit auf, um einen mechanischen Widerstand für die Messspitze zu geben [122]. Bei den Strukturen in [Abbildung 25](#) handelt es sich um Zell-Zell-Verbindungen. Die Mikrotubuli, als Bestandteil des Zellskeletts, gehen von einer zentralen Struktur aus. Dieses „Mikrotubuli-organisierendes Zentrum“ ist in [Abbildung 26](#) zu sehen.

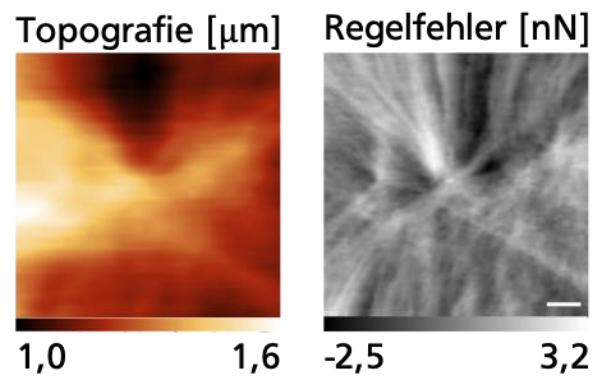


Abbildung 26 Detailausschnitt der mit einem Pfeil markierten Bereichs in [Abbildung 24 d](#). Die Topografie und der Regelfehler sind dargestellt. Zu erkennen ist ein Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC, *microtubule organizing center*). Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 µm.

Während in der Abbildung der Topografie die aufeinander zu laufenden Mikrotubuli nicht klar voneinander unterscheidbar sind, lässt die Abbildung des Regelfehlers auch hier eine klare Darstellung der Struktur erkennen. Strahlenförmig von der Mitte des Bildes ausgehend lassen sich vier Bündel erkennen, die sich aus dem Bild heraus über die Zellen spannen.

7.3. Zusammenfassung

Quasistatische Rasterkraftmikroskopie ermöglicht es, sehr weiche Proben auf einer großen Fläche abzubilden. Hier wurden unterschiedliche lebende, menschliche Zellen untersucht. Mit dieser Methode ist es möglich neben der Topografie der Zellen auch innere Strukturen sichtbar zu machen. So kann beispielsweise der Zellkern identifiziert werden, das Zellskelett und Zell-Zell-Verbindungen. Nicht möglich ist es jedoch, die Tiefenlage solcher Strukturen zu bestimmen. Diese Strukturen werden hier über den Regelfehler sichtbar, der eine Tiefenbestimmung nicht zulässt.

8. Nanomechanische Charakterisierung von lebenden menschlichen Zellen unter der Oberfläche

In Kapitel 7 wurde bereits gezeigt, dass lebende, menschliche Zellen mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet werden können und auch deren innere Struktur sichtbar gemacht werden kann. Jedoch ist bei der dort angewandten Methode keine Tiefenauflösung vorhanden und eine mechanische Quantifizierung in der Tiefe nicht möglich. Das folgende Kapitel soll zeigen, wie diese Nachteile umgangen werden können.

Der Inhalt dieses Kapitels wurde bereits in [37] veröffentlicht.

8.1. Einführung

Üblicherweise werden Zellen mittels optischer Mikroskopiemethoden untersucht. Dazu stehen eine Reihe unterschiedlicher Kontrastmethoden zur Verfügung: Amplitudenkontrast (Hellfeld), Phasenkontrast, differenzieller Interferenzkontrast, Polarisationsmikroskopie, Dunkelfeld Kontrast oder Fluoreszenzmikroskopie. Mit diesen Methoden ist es möglich, die für sichtbares Licht sehr transparenten biologischen Zellen sichtbar zu machen und auch bestimmte Organellen in den Zellen zu verdeutlichen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie können beispielsweise der Zellkern, Aktinfilamente, Mikrotubuli oder fokale Adhäsionspunkte in den Zellen angefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Jedoch sind diese Abbildungen immer die zweidimensionale Projektion eines dreidimensionalen Objekts. Die Positionen der Tiefenlage der angefärbten Objekte geht im Allgemeinen verloren, wenn einfache Fluoreszenzmikroskopie benutzt wird. Mit einem konfokalen Aufbau ist es möglich, durch verschiedene Schichten hindurch zu gehen und eine dreidimensionale Abbildung zu erstellen. Jedoch ist die Auflösung durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts begrenzt. Diese Grenze kann mit deterministischen oder stochastischen Mikroskopiemethoden umgangen werden [123, 124].

Für eine mechanische Charakterisierung der Proben, sind diese Methoden nicht geeignet. Eine Kombination aus optischen Methoden und Rasterkraftmikroskopie kann jedoch beide Informationen liefern: die Identifikation von subzellularen Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie und die nanometergenaue mechanische Charakterisierung in alle Raumrichtungen mittels Rasterkraftmikroskopie.

Betrachtet man einzelne Zellen, so sind Krebszellen im Allgemeinen weicher, als ihre gesunden Varianten. Das kann sehr gut mittels rasterkraftmikroskopiebasierten Kraft-

Abstands-Kurven-Messungen gezeigt werden, wenn mit einer definierten Kugel auf die zu untersuchende Zelle gedrückt wird („colloidal probe technique“). In diesem Fall ist jedoch die Auflösung durch die verhältnismäßig große Kugel als Messsonde am Biegebalken (typischer Durchmesser: $1\ \mu\text{m}$) sehr begrenzt und es ist nicht möglich den lokalen Ursprung der Veränderung in den mechanischen Eigenschaften zu sehen. Dazu sind Messungen mit hoher Auflösung notwendig, was erreicht werden kann, wenn scharfe AFM-Spitzen benutzt werden.

Erste Arbeiten, in denen biologische Proben mittels statischer Kraft-Abstands-Kurven mit hoher Auflösung untersucht wurden, stammen von Roduit et al. [125]. Hier wurden sowohl lebende Neuronen, als auch Markophagen untersucht [126] und die Methode als „Stiffness Tomography“ bezeichnet. Mit dieser Methode ist es möglich, dreidimensionale Abbildungen der mechanischen Eigenschaften zu erhalten. Schon zuvor wurden solche Messungen durchgeführt, aber die Auswertung führte nur zu zweidimensionalen Abbildungen [127], wobei die Idee eine dreidimensionale Auswertung vorzunehmen schon existierte [128], aber technisch nicht umgesetzt wurde.

Bis heute wurde diese Methode auf einer Vielzahl von weichen Materialien angewandt, beispielsweise: Polymeren [129], Biopolymeren [130], Bakterien [131], Zellen [126] und Zellorganellen [132]. Es ist zusätzlich möglich, spezifische Moleküle an die AFM-Spitze zu binden und gleichzeitig zu den mechanischen Eigenschaften Ligand-Rezeptor-Interaktionen zu untersuchen [133]. Auch das Anbinden von Viren an die AFM-Spitze ist in dieser Weise möglich [134]. Verschiedene Software-Codes stehen heute zur freien Verfügung um solche Daten auszuwerten [135-137].

Wichtig zu bemerken ist, dass in den meisten Fällen bisher die Daten als zweidimensionale Abbildungen ausgewertet wurden.

Im Folgenden wird die dreidimensionale nanomechanische Charakterisierung von ganzen, lebenden Krebszellen vorgestellt. Sowohl das Vorgehen, wie auch die Ergebnisse werden diskutiert.

8.2. Experimentelles Vorgehen

In diesem Abschnitt werden alle Schritte dargestellt, die notwendig sind, um die Messungen durchzuführen und die Ergebnisse auszuwerten

8.2.1. Probenherstellung und Zellkultur

Die Herstellung der Proben erfolgt nahezu analog zu Kapitel 7.1.1. Die selben Krebszellen wie in Kapitel 7 wurden als Passage 40 vom Hersteller bezogen („BT-20“, CLS GmbH, Eppelheim, Deutschland), aufgetaut und in T25 Zellkulturflaschen kultiviert (Corning Life Sciences, Tewksbury, USA). Als Kulturmedium wurde DMEM mit hohem Glucoseanteil (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verwendet, dem als Wachstumsfaktor 10 % Fötale Kälberserum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und als Antibiotikum 1 % Penicillin und Streptomycin (Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt worden ist. Nach einer Inkubationsdauer von circa 1,5 bis 2 Tagen bei 37° C, 5 % CO₂ in der umgebenden Luft, sowie 100 % Luftfeuchtigkeit, waren die Zellkulturflaschen konfluent bewachsen. Nach drei Passagen wurden die Zellen in Glaspetrischalen (Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) weiter kultiviert, um Fluoreszenz und AFM Experimente gleichzeitig durchführen zu können.

8.2.2. Optische Mikroskopie

Um die Zellkerne zu markieren, wurden 2 μ l DAPI Lösung (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 2 ml Zellkulturmedium gegeben und die zu untersuchenden Zellen darin 10 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Zellen im optischen Mikroskop („Axiovert“, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) im Hellfeld und Fluoreszenz untersucht. Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einer „Colibri“-LED-Lichtquelle (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), mit einer Anregungswellenlänge $\lambda_{anr} = 365 \text{ nm}$.

8.2.3. Rasterkraftmikroskopie

Die lebenden Zellen wurden bei Raumtemperatur in ihrem Kulturmedium in einer Petrischale gemessen. Ein Rasterkraftmikroskop „NanoWizard II“ (JPK BioAFM Business, Berlin, Deutschland) wurde benutzt, um Karten von Kraft-Abstands Kurven aufzunehmen. Als Biegebalken diente ein „SNL-D“ (Bruker AFM Probes Nanofabrication Center,

Camarillo, USA) mit einer typischen optischen Sensitivität von $s \approx 55 \text{ nm/V}$ und einer typischen Federkonstante von $k \approx 0.07 \text{ N/m}$. Vor jeder Messung wurde der jeweilige Biegebalken hinsichtlich seiner Federkonstante und seiner optischen Sensitivität kalibriert. Auf konfluenten Bereichen der Zellkultur wurden auf einer Fläche von $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ jeweils 256×256 Kraft-Abstands Kurven aufgenommen. Das ergibt eine laterale Auflösung von $117 \times 117 \text{ nm}^2$ pro Pixel. Die Länge jeder Kraft-Abstands Kurve wurde auf $3 \mu\text{m}$ eingestellt, die Geschwindigkeit in z-Richtung auf $v_z = 80 \mu\text{m/s}$ (das bedeutet circa 27 Kurven pro Sekunde), bei einer Datenerfassungsrate von circa 16 kHz, was zu einer Tiefenauflösung von circa 5 nm pro Messpunkt führt. Die Führungsgröße (und damit das Ende der jeweiligen Kraft-Abstands Kurve) wurde bei einer wirkenden Kraft von 2 nN festgelegt. Die Kraft muss groß genug sein, um eine signifikante Eindringtiefe in die Zelle zu erreichen, aber klein genug, damit die Zelle keinen Schaden nimmt. Es war möglich dieselbe Stelle mehrere Male hintereinander zu messen, ohne dass Schäden an der Zelle festgestellt werden konnten. Um Karten mit hoher Auflösung zu erhalten, wurden auf $6 \times 6 \mu\text{m}^2$ jeweils 128×128 Kraft-Abstands Kurven aufgenommen, was zu einer lateralen Auflösung von circa $47 \times 47 \text{ nm}^2$ pro Pixel führt. Alle anderen Einstellungen blieben gleich.

Die Dauer einer Messung betrug für die größeren Ausschnitte mit niedriger Auflösung circa 4 Stunden und für die kleinen Ausschnitte mit hoher Auflösung circa 30 Minuten. Um optische und AFM-Bilder überlagern zu können wurden mit der Messsonde 25 Referenzpunkte für ein Bild angefahren und so die optischen und rasterkraftmikroskopischen Bilder miteinander kalibriert („DirectOverlay™“, JPK BioAFM Business, Berlin, Deutschland).

8.3. Auswertung der Daten

Es sind mehrere Schritte zur Auswertung der Daten erforderlich. Die Abfolge und Korrektur der gemessenen Kraft-Abstands Kurven durch die Bearbeitung wurde im Allgemeinen in Kapitel 3.2 erklärt und dort in **Abbildung 10** dargestellt.

Hier werden zunächst die gemessenen Daten mit einem Savitzky-Golay Filter geglättet [65]. Dabei werden die Daten durch eine polynomiale Regression aus äquidistanten Stücken beschrieben. Das ist notwendig um Rauschen, durch die für rasterkraftmikroskopische Messungen laute Umgebung im Labor, zu unterdrücken.

Im zweiten Schritt wird eine lineare Funktion an den flachen Bereich (der „Basislinie“) zu Beginn der jeweiligen Kraft-Abstands Kurve angepasst. Diese lineare Funktion wird dann von der ganzen Kurve abgezogen, sodass die Basislinie auf der Nulllinie liegt.

Um den Kontaktpunkt zwischen Spitze des Biegebalkens und der Oberfläche der zu messenden Zelle zu bestimmen, wird der Datenpunkt gefunden, der als erster, beim Annähern an die Oberfläche, um mindestens das Zehnfache der Standardabweichung der Basislinie abweicht. Die Kraft-Abstands Kurve wird im dritten Schritt z -Richtung verschoben, sodass der Kontaktpunkt bei $z=0$ liegt.

Um die tatsächliche Position der Spitze auf der z -Achse auftragen zu können, muss die Höhe mit der Verbiegung des Biegebalkens korrigiert werden. Dazu wird in einem vierten Schritt die durch die Kraft wirkende Verbiegung von der Höhe abgezogen (siehe Kapitel 2.5 Formel (14)).

Verschiedene physikalische Größen können nun aus den Daten abgelesen werden:

- die Position des Kontaktpunktes → die Topografie der Probe
- die Position bei dem Erreichen des Kraft-Sollwerts
- die maximale Eindringtiefe, also die Strecke von Kontaktpunkt bis Erreichen des Kraft-Sollwerts

Zwei weitere Größen können erhalten werden, wenn:

- eine lineare Funktion an den ansteigenden Bereich abstoßender Kräfte angepasst wird, deren Steigung ist die effektive Spitze-Probe Steifigkeit
- $F(h) = \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \frac{\tan \alpha}{\sqrt{2}} \cdot h^2$ an den Großteil der gemessenen Kurve angepasst wird, ergibt den Elastizitätsmodul der Probe an dem jeweils gemessenen Punkt, mit $\alpha=20^\circ$ und $\nu=0,5$ (vgl. auch Kapitel 2.6) → „kumulativer“ Elastizitätsmodul

Die gemessenen Kraft-Abstands-Kurven können auch schrittweise (hier: in Schritten von 20 nm) ausgewertet werden. Die auf diese Weise erhaltenen Größen sollen im Folgenden „**lokal**“ genannt werden (vgl. auch Kapitel 2.6). Die vorher genannte und übliche Variante, bei der die Größen aus dem Großteil der Kurve durch eine Fitfunktion (und nicht schrittweise) abgelesen werden, sollen im Folgenden „**kumulativ**“ genannt werden.

Direkt auslesbare lokale Größen sind:

- Die lokale Kraft, also die Kraft, die in einer bestimmten Eindringtiefe auf die Spitze des Biegebalkens wirkt
- Die lokale Steigung, das heißt die Ableitung der Kraft nach der Eindringtiefe, also die lokale effektive Spitze-Probe Steifigkeit

Um auch den Elastizitätsmodul lokal auswerten zu können, wird die Funktion zunächst über h^2 aufgetragen. Die Art der Auftragung ist abhängig von der Spitzengeometrie (siehe Kapitel 2.6). Der lokale E-Modul ergibt sich dann aus der Steigung dieser Kurve. So können Karten der Kraft, Steigung und des Elastizitätsmoduls in jeder beliebigen Eindringtiefe erstellt werden oder auch Schnitte durch die xz- oder yz-Ebene, wie auch dreidimensionale Abbildungen.

Um die Daten zu verarbeiten, wird ein „Matlab“ [138] Skript verwendet. Dieses erlaubt die Daten einzulesen, die Korrekturen vorzunehmen und die Berechnungen der „kumulativen“ und „lokalen“ Größen durchzuführen. Dieses Skript basiert auf Arbeiten von Spitzner, Riesch, Dehnert und Magerle (TU Chemnitz). Die zweidimensionale Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels der freien Software „ImageJ“ [139] und „Gwydion“ [118]. Dreidimensionale Darstellungen werden mit der freien Software „Blender“ [140] realisiert.

8.4. Ergebnisse und Diskussion

Zunächst sollen hier die Ergebnisse der optischen und Fluoreszenzmikroskopie im Zusammenhang mit der kumulativen Auswertung der Karten von Kraft-Abstands Kurven präsentiert und diskutiert werden. In **Abbildung 27** sind die Ergebnisse dieser Messungen anhand einer fluoreszenzgefärbten Probe von BT20 Zellen dargestellt.

Die Abbildungsteile a) und b) zeigen die Ergebnisse der optischen Mikroskopie. Das in diesen beiden Abbildungsteilen eingezeichnete, weiße Quadrat zeigt den Ausschnitt, der im Anschluss mittels Rasterkraftmikroskopie ausgewertet wurde. Bereits im Hellfeld der optischen Mikroskopie (**Abbildung 27** a) können die Positionen und Abmessungen der Zellkerne sehr gut bestimmt werden. Die Kernkörperchen (die „Nukleoli“) im Zellkern sind ebenfalls als dunklere Punkte sichtbar. Die Begrenzungen der jeweiligen Zelle zur Nachbarzelle oder dem umgebenden Medium sind ebenfalls noch zu erkennen. Um die Positionen und Ausdehnungen der Zellkerne zu bestätigen wurden diese mittels

DAPI Fluoreszenzgefärbt (**Abbildung 27 b**). In der Fluoreszenzabbildung sind die Zellkerne sehr gut abgetrennt von der Umgebung zu erkennen.

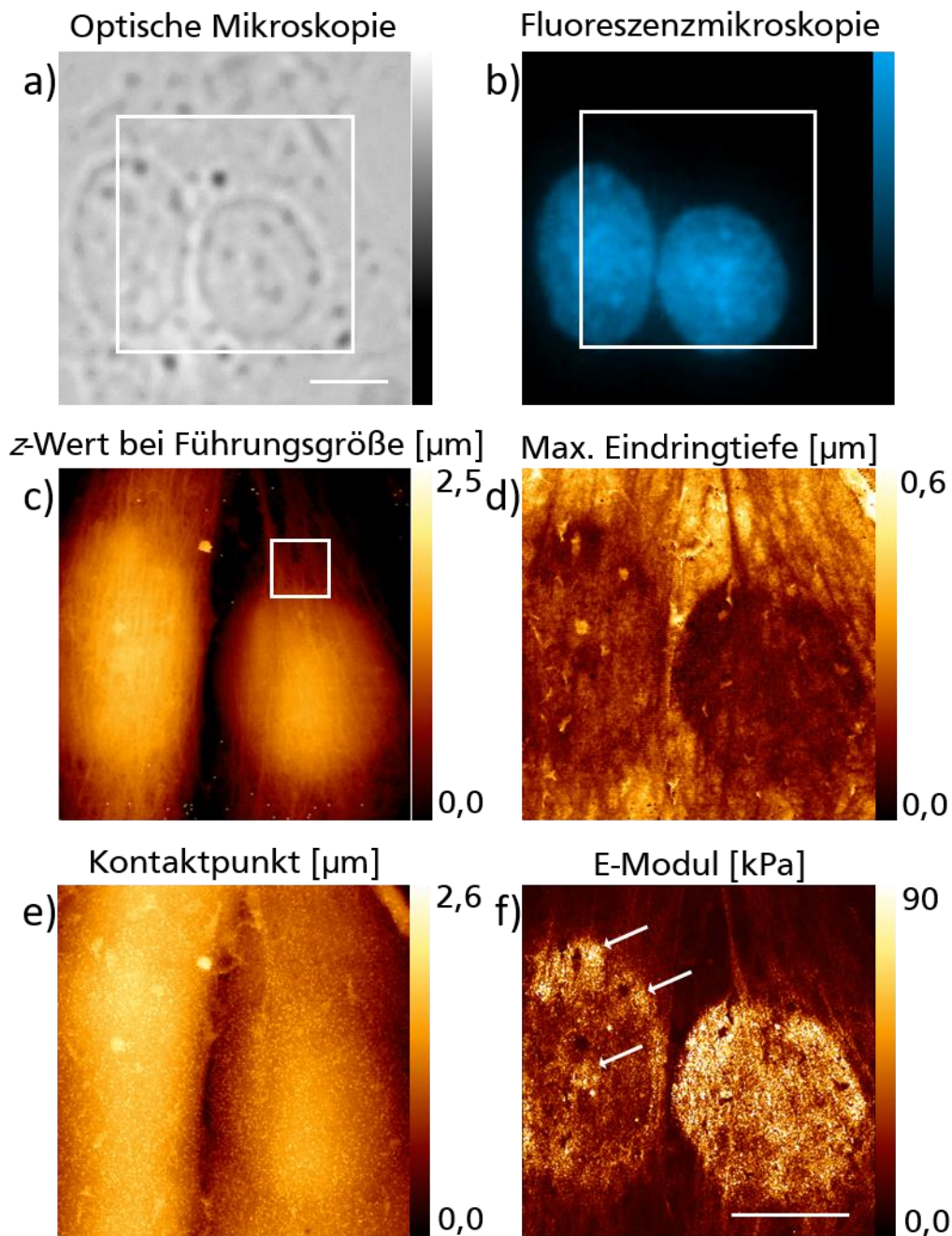


Abbildung 27 Optische und rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von zwei lebenden, menschlichen (Krebs-)Zellen des Typs BT-20. Die Abbildungen a) und b) zeigen optische Aufnahmen, a) eine Hellfeldabbildung, b) die mit DAPI fluoreszenzgefärbten Zellkerne. Die Abbildungen c) bis f) zeigen rasterkraftmikroskopische Messergebnisse, in dem in a) und b) durch ein weißes Rechteck gekennzeichneten Ausschnitt. In c) ist die Höhe bei Erreichen der Führungsgröße abgebildet. Die maximale Eindringtiefe der Messspitze in die Probe ist in d) dargestellt. e) zeigt die Höhenposition des Kontaktpunkts und damit die Topografie der Zelloberfläche, der kumulative Elastizitätsmodul ist in f) dargestellt, besondere Stellen sind mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet und im Text erläutert. Die Länge des Skalenbalkens beträgt $10\ \mu\text{m}$.

Die weiteren Abbildungsteile (c-f) stellen die kumulative Auswertung der Rasterkraftmikroskopischen Messungen dar. Abbildungsteil c) zeigt die h-Position der Messspitze beim Erreichen des Kraft-Sollwertes und kann als eine Mischung aus Topografie und mechanischen Eigenschaften verstanden werden. Die beiden Zellkerne sind als höherliegende Objekte klar von ihrer Umgebung abgetrennt zu erkennen. Gleichzeitig ist ein faserartiges Netzwerk zu sehen, dass sich über die Zellkerne spannt und auch in die Zellperipherie eindringt. Das kleine, weiße Quadrat in diesem Abbildungsteil zeigt den später hochauflösend gemessenen Ausschnitt auf der Probe. Abbildungsteil d) zeigt die Tiefe des Eindringens in die Zelle, also den Abstand in h-Richtung zwischen Kontaktpunkt und dem Punkt des Erreichens des Kraft-Sollwertes. Auch hier ist das faserartige Netzwerk zu erkennen, als Bereich geringerer Eindringung. Die beiden Zellkerne sind ebenfalls als Bereiche geringerer Eindringung zu erkennen. Die Eindringtiefen in die Kerne und auch in das faserartige Netzwerk liegen im Bereich von $\delta_{Eind} = [300 - 400] \text{ nm}$. Der umgebende Bereich weist eine Eindringung von bis zu 600 nm auf. Innerhalb der Zellkerne sind Sprenkel höherer Eindringung zu erkennen. Abbildungsteil e) zeigt die jeweilige h-Position des Kontaktpunktes und damit die wahre Oberfläche (=Topografie) der Zelle. Beide Zellen können als getrennte Objekte erkannt werden. Ihre Oberfläche ist jeweils gekrümmt und weist eine Vielzahl von Merkmalen auf, die später noch genauer beschrieben werden. Das faserartige Netzwerk ist ebenfalls gut zu erkennen. Der letzte Abbildungsteil f) zeigt den kumulativen Elastizitätsmodul. Auch hier sind die beiden Zellkerne wieder gut sichtbar und von der Umgebung abgetrennt zu erkennen. Die Sprenkel in ihrem Inneren sind als weichere Bereiche sichtbar. Der linke Zellkern weist eine weniger gleichmäßige Verteilung des Elastizitätsmoduls auf: gerade um die weicheren Sprenkel liegen Bereiche, die härter sind, als der sonstige Bereich des Zellkerns. Diese Positionen sind durch Pfeile im Bild deutlich gemacht. Das faserartige Netzwerk erscheint in der Zellperipherie als etwas weicher, als die Zellkerne. Mit einer weiteren Zellprobe wurde verfahren, wie mit der eben vorgestellten. In **Abbildung 28** sind die Oberflächen der beiden Proben nebeneinander dargestellt. Sie sollen im Folgenden genauer ausgewertet werden.

Dargestellt ist jeweils die z-Position der Spitze bei Erreichen des Kontaktpunktes, also die Topografie der äußeren Zellbegrenzung. Beide Aufnahmen sind sich grundsätzlich ähnlich: die Oberflächen und Begrenzungen der Zellen sind erkennbar, das faserartige

Netzwerk zeigt sich in beiden Messungen, genauso wie Sprengel im Bereich der Zellkerne.

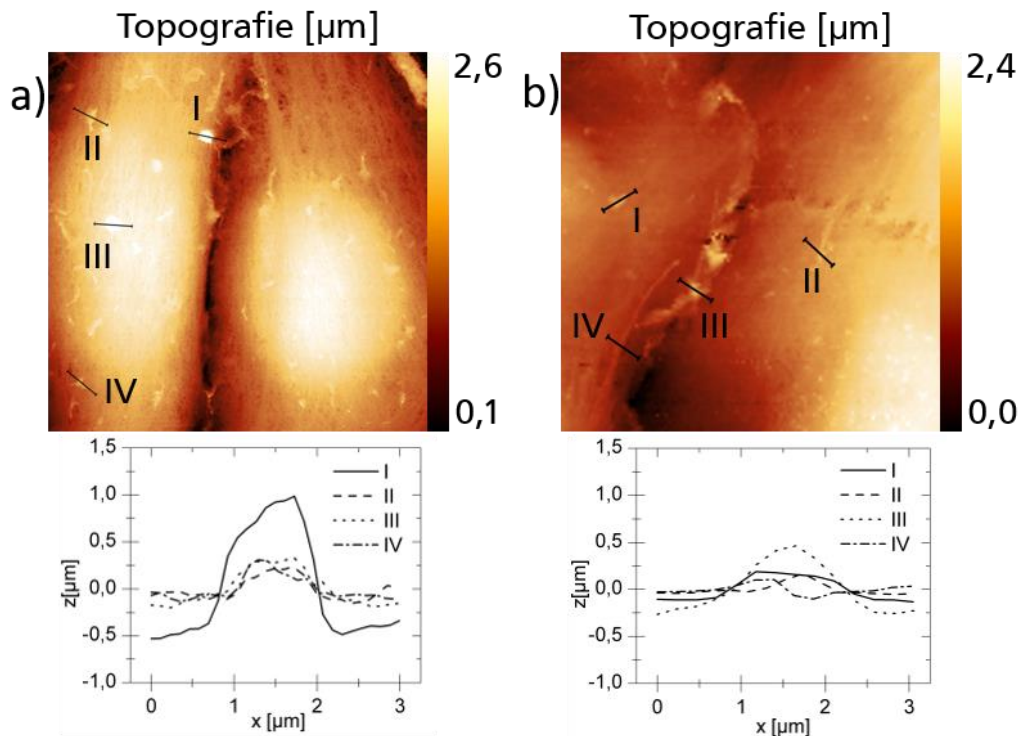


Abbildung 28 Die Topografie zweier unterschiedlicher Proben lebender, menschlicher Zellen. Einzelne, besondere Stellen sind herausgegriffen und deren Profil der Topografie dargestellt und im Text genauer erläutert. Bild a) entspricht **Abbildung 27** e.

In beiden Aufnahmen wurden an jeweils 4 Stellen Höhenprofile extrahiert und separat dargestellt. Positionen a.I und a.III in Abbildungsteil a) zeigen kreisförmige Objekte, die aus der Zellmembran herausragen. Im Vergleich zu ihrer direkten Umgebung haben diese beiden Objekte eine Höhe von $1,0 \mu\text{m}$ (Position a.I) und $0,4 \mu\text{m}$ (Position a.III). Die Objekte an den Positionen a.II und a.IV ragen deutlich weniger aus der Zellmembran heraus und sind auch nicht rundlich geformt, eher faserartig. Solche Objekte finden sich auch in Abbildungsteil b). Zum Beispiel hat das Objekt an Position b.I in Abbildungsteil b) eine ähnliche Form und Ausdehnung, wie a.II und a.IV. Die Objekte an den Positionen b.II und b.IV haben jedoch eine längliche Form, wobei sie sich in ihrer Ausdehnung deutlich unterscheiden. Das Objekt an Position b.IV ist circa dreimal so lang ($15 \mu\text{m}$), wie das an Position b.II ($5 \mu\text{m}$). Das Objekt an Position b.III hat eine unregelmäßige und knubbelige Form und scheint zwei Zellen miteinander zu verbinden.

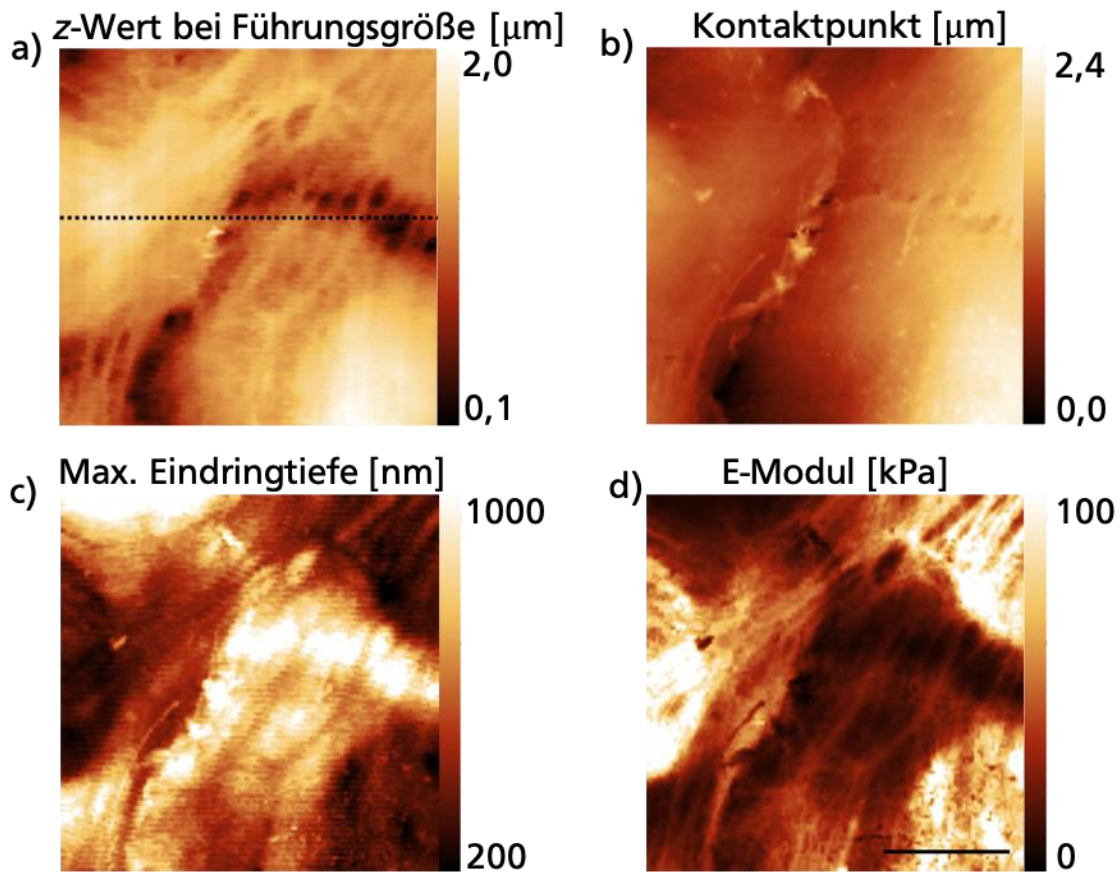


Abbildung 29 Kumulative Auswertung verschiedener Größen einer rasterkraftmikroskopischen Messung an lebenden menschlichen Zellen. Abbildungsteil a) zeigt die Höhe bei Erreichen der Führungsgröße der Kraft, b) die Topografie (als Position des Kontaktpunkts), in c) die maximale Eindringtiefe der Messspitze in die Probe und in d) den kumulativen E-Modul. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 10 μm . Die gestrichelte Linie deutet die Position der xz-Schnitte in Abbildung 31 an.

Abbildung 29 zeigt die gesamte Auswertung des Datensatzes von **Abbildung 28 b**. In den Abbildungsteilen a bis d sind Karten der kumulativen Auswertung dargestellt, wie es bereits in **Abbildung 27 d bis f** für andere Messdaten durchgeführt worden ist. Abbildungsteil a) zeigt die Position der Messspitze bei Erreichen des Kraft-Sollwertes b) zeigt die Position des Kontaktpunkts, also die Topografie der Zelle. Abbildungsteil c) den Abstand zwischen Kontaktpunkt und Erreichen des Kraft-Sollwertes, also die maximale Eindringtiefe und Abbildungsteil d) schließlich den kumulativen Elastizitätsmodul. Die gestrichelte, weiße Linie deutet die Position der xz-Profile an, die in **Abbildung 31** dargestellt sind. Dort wird die jeweilige Größe (wirkende Kraft, Änderung der Kraft und E-Modul) lokal ausgewertet.

Die kumulative Auswertung zeigt dieselben Tendenzen, wie sie bereits in der vorherigen Probe mit zwei Zellen sichtbar gewesen waren: Zellkerne als topografisch erhabene

Strukturen mit höherem Elastizitätsmodul, faserartiges Netzwerk auf den Zellkernen und in der Peripherie der Zellen, sowie Objekte auf der Zellmembran. Auffallend sind die Sprenkel höheren Elastizitätsmoduls innerhalb der Zellkerne, die insbesondere im Zellkern rechts unten auffallen. Bei diesen Bereichen handelt es sich um Kernkörperchen, dichtgepackte Bereiche ribosomaler DNS. Mittels Brillouinmikroskopie konnte bereits gezeigt werden, dass Kernkörperchen einen höheren Elastizitätsmodul aufweisen, als die Kernhülle oder das Zytoplasma [141].

Verschiedene Bereiche der Zelle weisen also charakteristische mechanische Eigenschaften auf. Das ist in **Abbildung 30** genauer untersucht. Dazu wurde ein Histogramm des E-Moduls aus **Abbildung 29 d** erstellt (dessen Fläche ist auf 1 normiert).

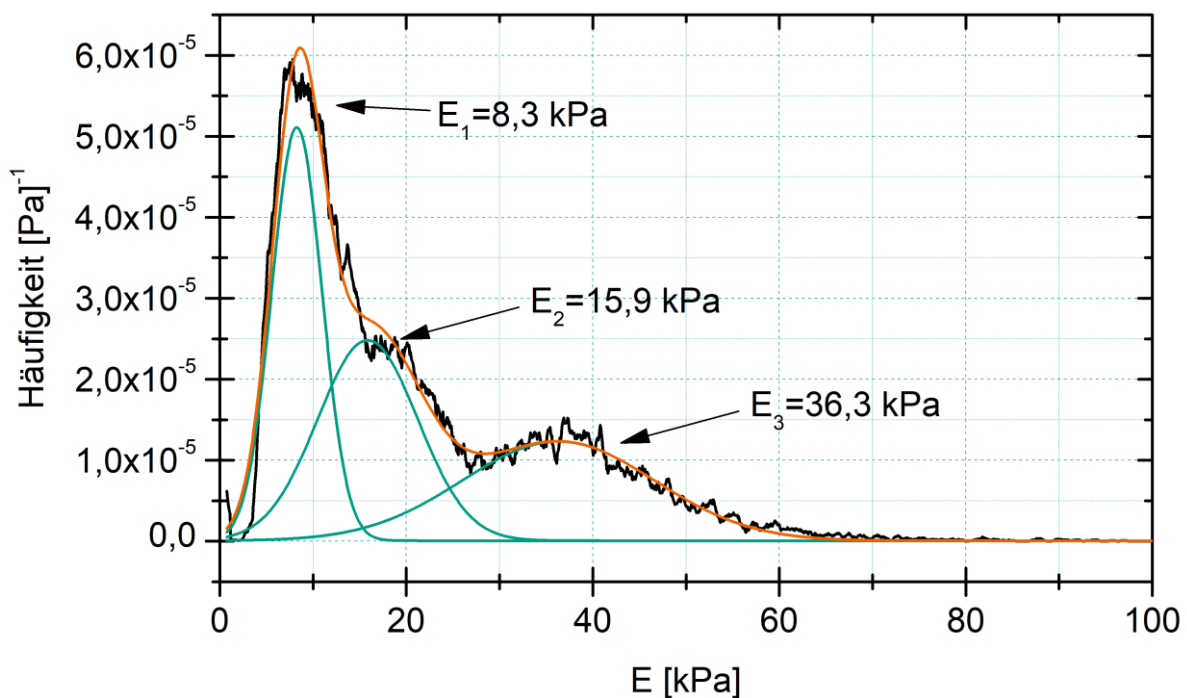


Abbildung 30 Häufigkeitsverteilung des E-Moduls der Messung aus **Abbildung 29 d**). Der schwarze Graf zeigt die tatsächliche Verteilung, in grün sind drei Gauß-Verteilungen eingezeichnet, die mit den drei lokalen Maxima des schwarzen Grafen korrespondieren. Der orangene Graf zeigt die Summenkurve der Gauß-Verteilungen.

Offenbar treten drei verschiedene Module auf. Drei verschiedene Gauß-Kurven wurden an die Daten angepasst und deren Maxima ausgelesen. Es sind drei Bereiche erkennbar, die dem Zellkern, dem Zellskelett und der umgebenden Zellbereich zugeordnet werden können: $E_{Kern} = 36 \text{ kPa}$, $E_{Skelett} = 16 \text{ kPa}$ und $E_{Umgebung} = 8 \text{ kPa}$. Die hier erhaltenen Werte sind um eine Größenordnung niedriger, als bei Messungen der mechanischen

Eigenschaften einer Doppellipidschicht mittels Rasterkraftmikroskopie in [142, 143]. Obwohl die Messmethode sehr ähnlich ist, liegen die erhaltenen Werte weit auseinander. Wichtigster Grund dafür ist: die mechanischen Eigenschaften des Substrats, auf dem sich die zu messende Schicht befindet, wirken in die Probe hinein [144]. Bei den Messungen hier liegt unter der Zellmembran die eigentliche Zelle – bei den zitierten Referenzmessungen liegt die „Zellmembran“ direkt auf dem Substrat auf.

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die Auswertung der gemessenen Kraft-Abstands Kurven kumulativ (also als Ganzes) erfolgt ist, soll im Folgenden eine lokale Betrachtung gewählt werden. So wird (wie oben beschrieben) ermöglicht, tiefenaufgelöst lokale Größen zu erhalten und in die Probe hinein zu sehen.

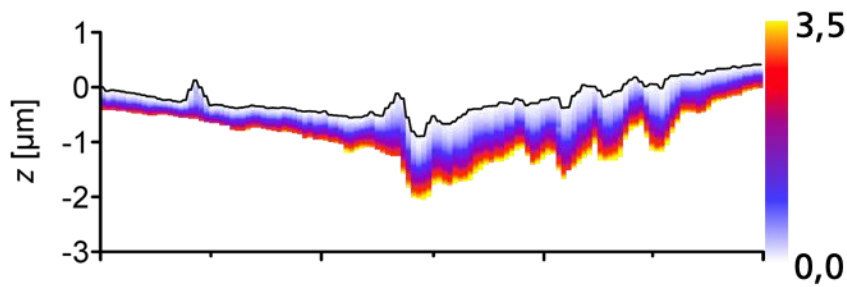
In der lokalen Auswertung der Daten in **Abbildung 31**, sind drei Größen in x-Richtung als Funktion der z-Position ausgewertet und dargestellt: die lokale Kraft, die lokale Steigung und der lokale Elastizitätsmodul. Die Topografie des Schnitts ist als schwarze Linie dargestellt.

Die lokale Kraft nimmt monoton mit der Tiefe zu. Lokale Unterschiede oder Auffälligkeiten sind nicht zu erkennen. Die lokale Steigung zeigt jedoch einen komplexeren Verlauf. Grundsätzlich nimmt die Steigung zwar zu, je tiefer in die Zelle eingedrungen wird, zeigen sich jedoch im Verlauf durch die x-Richtung deutliche Unterschiede. Im linken und im ganz rechten Bereich ist der Anstieg der Steigung deutlich sichtbar größer, als im dazwischenliegenden Bereich.

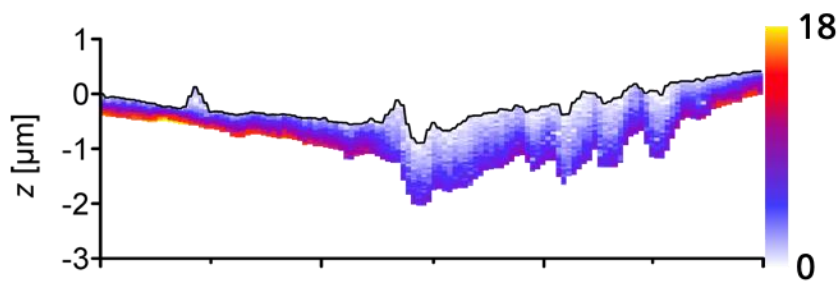
Die Randbereiche sind genau die Bereiche, an denen jeweils die Zellkerne lokalisiert sind, der Zwischenbereich besteht im Wesentlichen aus Zytoplasma. Betrachtet man den lokalen Elastizitätsmodul, so ist die auffallendste Beobachtung, eine (Deck-)Schicht mit hohem Elastizitätsmodul (gelber Bereich, circa 150 kPa), direkt unterhalb der Oberfläche. Diese Schicht zieht sich durch die gesamte Breite der Messung und ist nur an einigen Stellen unterbrochen. Unter dieser Schicht liegen Bereiche mit geringerem Elastizitätsmodul (blaue Bereiche).

Es ist bemerkenswert, dass diese weicheren Bereiche zuverlässig unter der härteren Schicht detektiert werden können. Ein Grund dafür könnte sein, dass auch die äußeren Zellbegrenzungen keine starren Gebilde sind, sondern flüssigkeitsartige Eigenschaften aufweisen können. So könnte die Messspitze reversibel durch diese Schicht dringen und darunterliegende Strukturen detektiert werden (vgl. **Abbildung 11 a**).

Lokale Kraft [nN]



Lokale Steigung der Kraft [mN/m]



Lokaler E-Modul [kPa]

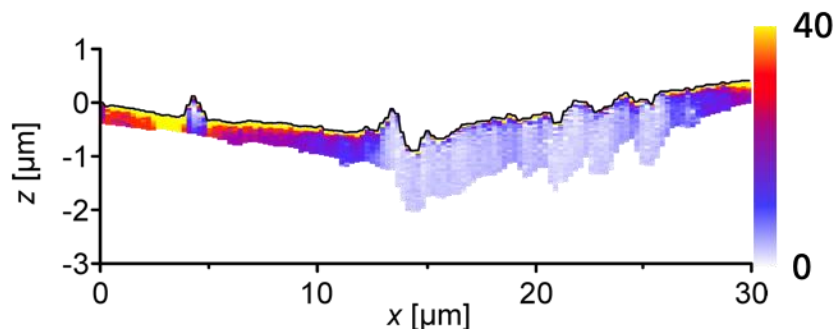


Abbildung 31 Lokale Darstellung der Kraft, der Steigung der Kraft und des E-Moduls als xz-Schnitte in die Tiefe der in **Abbildung 29** gezeigten Messung (an der Position der gestrichelten Linie).

Nur mit der lokalen Auswertung der Kraft-Abstands Kurven ist es möglich solche Veränderungen im Elastizitätsmodul zu beobachten und insbesondere unterhalb von härteren Schichten, weichere Bereiche zu identifizieren.

Im Folgenden soll die Betrachtungsweise geändert werden und xy-Ebenen in verschiedenen Eindringtiefen betrachtet werden. In **Abbildung 32** ist der in **Abbildung 27 c** als weißes Quadrat markierte Ausschnitt dargestellt. Die Größen Steigung, Kraft und Elastizitätsmodul werden für die jeweilige Eindringtiefe ausgewertet dargestellt.

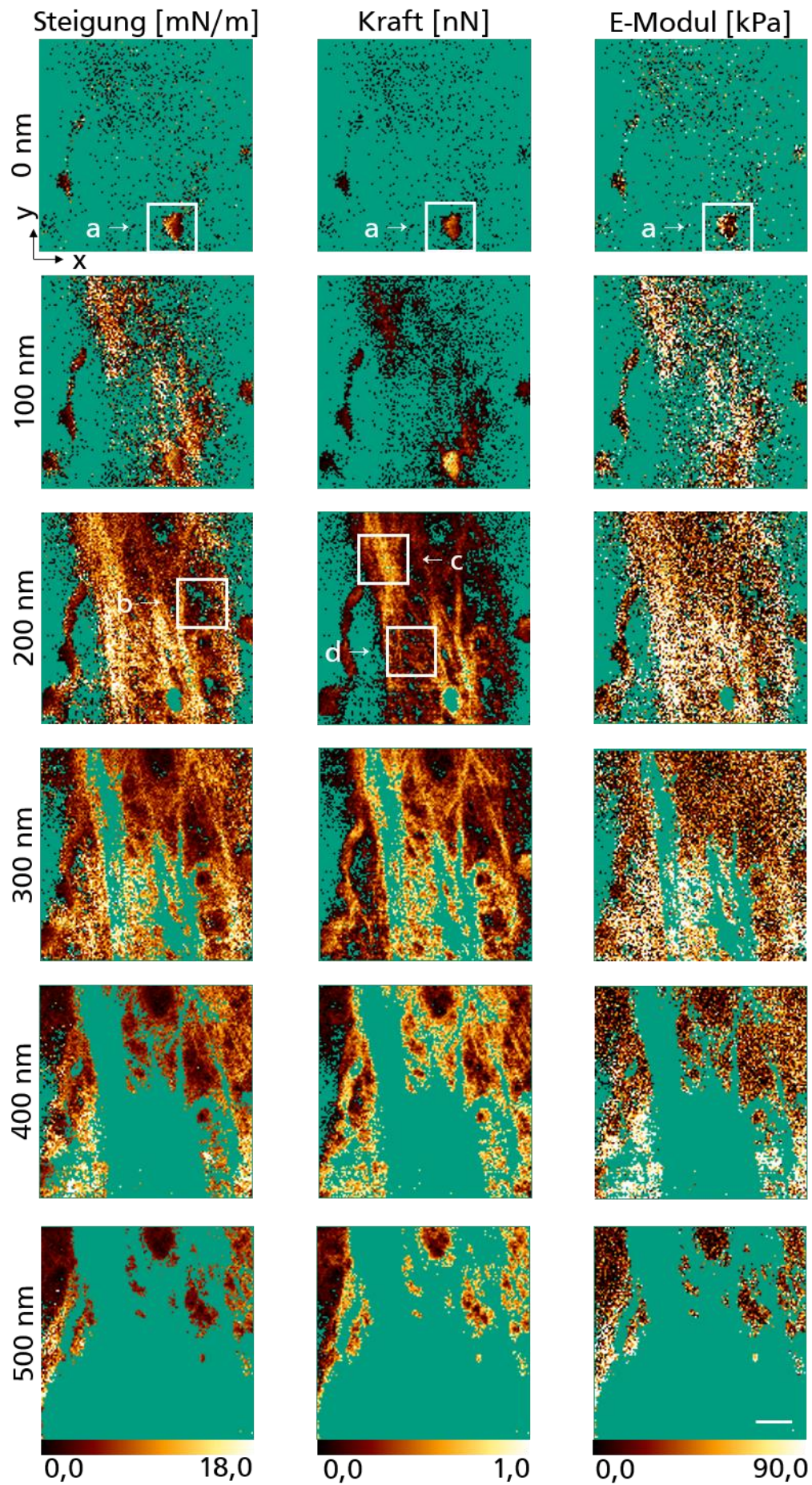


Abbildung 32 Die Steigung der Kraft, die Kraft und der E-Modul eines Ausschnitts aus der Probe aus **Abbildung 27** sind tiefenaufgelöst in verschiedenen Schnitten dargestellt. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 μm .

Diese Messergebnisse zeigen zunächst zwei Dinge: erstens sind die Proben bei Raumtemperatur stabil genug, sodass es möglich ist, dieselbe Stelle mehrmals hintereinander abzubilden und zweitens sind auch höhere Auflösungen in der Ebene (besser als 50 nm) möglich, beides ohne die Zelle dabei zu schädigen.

In allen ausgewerteten Größen sind Strukturen zu erkennen, die je nach Eindringtiefe entstehen und dann wieder verschwinden. Es treten zwei verschiedene Arten von Strukturen auf: faserartige Netzwerkstrukturen und flache Bereiche, die von den faserartigen Strukturen begrenzt werden. Die faserartigen Netzwerke lassen sich dem Zellskelett zuordnen, die flachen Bereiche sind Regionen zwischen den Filamenten des Zellskeletts. Eine solche flache Struktur ist der mit „a“ markierte Bereich. Er tritt am Beginn der Abbildungsreihe auf und weist in allen drei dargestellten Größen höhere Werte auf, als seine Umgebung. Betrachtet man die Abbildungen der Kraft, so wird dies besonders bei einer Eindringtiefe von 100 nm deutlich: die flache Struktur ist klar erkennbar, als Bereich in dem eine deutlich höhere Kraft wirkt, als in der Umgebung. In den Darstellungen der Steigung und des Elastizitätsmoduls ist dieser Bereich in dieser Eindringtiefe jedoch nur noch schlecht zu erkennen. Das zeigt, dass die verschiedenen Größen unterschiedlich sensitiv zu bestimmten Strukturen sind. Im Bereich größerer Eindringtiefe verändert sich die Farbe der flachen Struktur zu grün: die maximale Eindringtiefe wurde erreicht, das heißt der Kraft-Sollwert (in diesem Fall 4 nN) würde bei weiterem Eindringen überschritten. Das bedeutet, dass diese Struktur in einem Bereich zwischen 0 nm und 200 nm Tiefe unterhalb der Zellmembran liegt. Die lateralen Abmessungen lassen sich ebenfalls ablesen: circa 0,6 μm in x-Richtung und circa 1,0 μm y-Richtung. In der Abbildungsreihe der Steigung der Kraft und der Kraft selbst, lässt sich die Netzwerkartige Struktur gut erkennen, die bereits in der kumulativen Auswertung sichtbar geworden ist. Hier ist es nun zusätzlich auch möglich, Informationen über die Tiefenlage dieser Strukturen zu erhalten. Im gezeigten Ausschnitt scheint die Struktur eine Vorzugsorientierung in y-Richtung zu haben. Sie begrenzt Zwischenräume, wie beispielsweise den mit „b“ markierten Bereich. Es lassen sich dickere Stränge (beispielsweise an Position „c“) von dünneren unterscheiden (beispielsweise an Position „d“). Bemerkenswert ist, dass diese Strukturen in der Abbildungsreihe des Elastizitätsmoduls nicht sichtbar sind. Die Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften zwischen den

verschiedenen Strukturen scheinen zu gering um in dieser Darstellung unterscheidbar zu sein. Je weiter die Spitze des Biegebalkens in die Zelle eindringt, desto mehr Strukturen verschwinden und der grüne Hintergrund wird sichtbar. Das liegt daran, dass jeweils der Kraft-Sollwert erreicht wurde und somit das Ende der Kraft-Abstands Kurve. Um Informationen aus tieferliegenden Bereichen zu erhalten, könnte ein höherer Kraft-Sollwert verwendet werden, eventuell unter Zuhilfenahme eines Biegebalkens mit einer höheren Federkonstante. Dies ginge dann aber zulasten der Sensitivität und könnte auch zu einer dauerhaften Schädigung von Strukturen in der Zelle führen.

Die aus der lokalen Auswertung gewonnenen Informationen können auch in einer Ausgabe mit den Informationen aus der kumulativen Auswertung und der optischen Mikroskopie dargestellt werden.

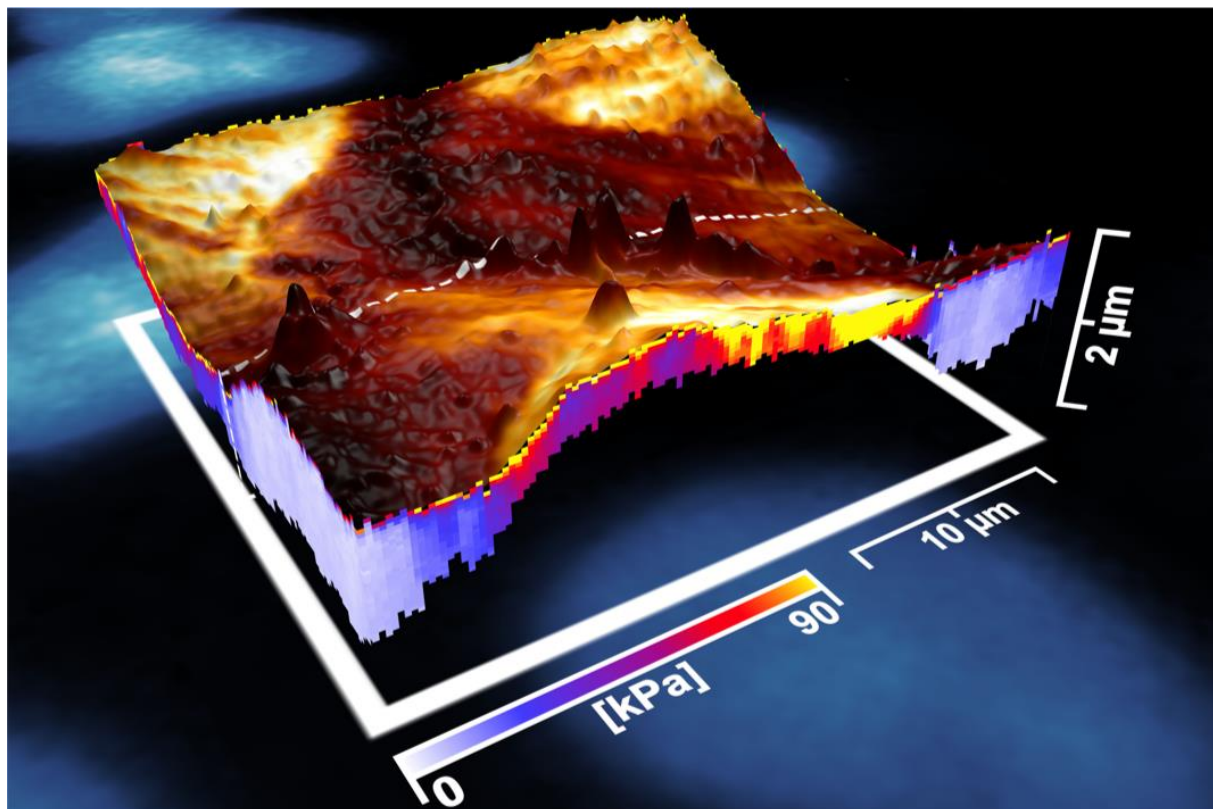


Abbildung 33 Dreidimensionale Darstellung der Tomografie nanomechanischer Eigenschaften lebender menschlicher Zellen. Die Abbildung zeigt die Messdaten aus [Abbildung 27](#) als dreidimensionale Darstellung in Kombination mit optischer Fluoreszenzmikroskopie. Die Topografie der Zelle ist dreidimensional dargestellt, der Farbcode der Oberfläche spiegelt den kumulativen E-Modul in dem jeweiligen Punkt wieder. Der lokale E-Modul in der Tiefe ist mit einer weiteren Farbskala codiert und hier an den Seitenflächen sichtbar. Die zweidimensionale Abbildung im Untergrund ist die Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gefärbten Zellkerne der Probe an dieser Stelle.

So erhält man eine dreidimensionale Darstellung der Volumenverteilung der mechanischen Eigenschaften einer Probe im oberflächennahen Bereich, angeordnet gemäß der

Topografie der Oberfläche und der entsprechenden Eindringtiefe und korreliert mit Ergebnissen der optischen Mikroskopie und kumulativen Auswertung.

Die **Abbildung 33** zeigt die Daten aus **Abbildung 29** und **Abbildung 31** in einer dreidimensionalen Darstellung. Die Rauheit der Oberfläche stellt die Topografie dar, also die jeweilige z-Position des Kontaktpunkts (vgl. **Abbildung 29 b**). Die Farbcodierung dieser Oberfläche repräsentiert den kumulativen Elastizitätsmodul. Die Werte des lokalen Elastizitätsmodul sind an ihren jeweiligen xyz-Positionen in ihrer jeweiligen Größe dargestellt. Unterhalb dieser Daten liegt als xy-Ebene die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Position und Ausdehnung der Zellkerne.

Auch hier ist wieder sichtbar, dass die Oberfläche der Zelle keine ebenmäßige Struktur aufweist, sondern verschiedene Ausstülpungen in verschiedenen Größen und Formen aufweist. Direkt unter der Oberfläche zeigt sich ebenfalls die circa 20 nm dünne Schicht hohen Elastizitätsmoduls, auf die ein Bereich mit geringerer Steifigkeit folgt. Die weiße, gestrichelte Linie in **Abbildung 33** deutet die Position an, in der die in **Abbildung 34** dargestellte xz-Ebene liegt.

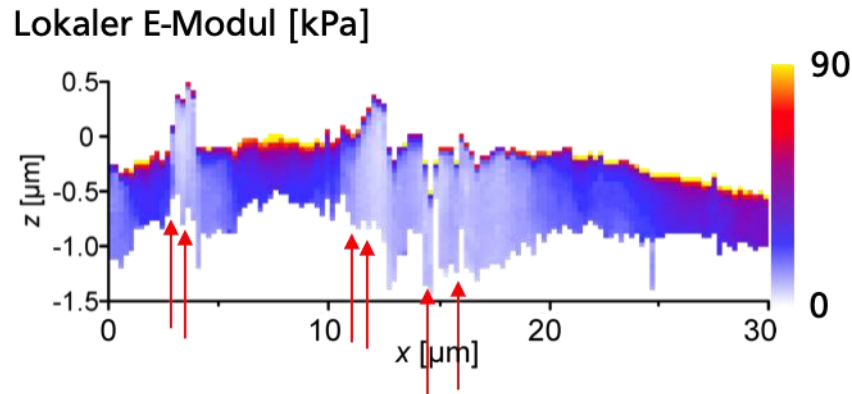


Abbildung 34 Schnitt in die Tiefe der Probe an der mit einer gestrichelten Linie markierten Stelle in **Abbildung 33**. Die Nanomechanik in der jeweiligen Stelle ist als lokaler E-Modul dargestellt. Die roten Pfeile markieren besondere Stellen und sind im Text genauer erklärt.

Man kann in dieser Darstellung gut erkennen, dass die obere Schicht mit hohem Elastizitätsmodul nicht vollständig durchgängig ist: an einigen Stellen ist sie unterbrochen und weist weiche, kanalartige Strukturen auf (durch Pfeile markiert). An diesen Stellen ist die maximale Eindringtiefe größer als in der direkten Umgebung. Hier kann die Spitze des Biegebalkens mit weniger Kraft und weiter in die Zelle eindringen.

Mechanisch betrachtet zeigt die Zellmembran verschiedene Inhomogenitäten und ist keineswegs eine homogene, abgeschlossene Schicht. Die hier verwendete Methode der

Rasterkraftmikroskopie kann diese charakteristische Eigenschaft besonders gut abbilden. Jedoch gibt es einige Effekte, die die Genauigkeit der Messungen beeinflussen, aber hier nicht berücksichtigt werden können. Der Elastizitätsmodul des Substrats, auf dem sich die Probe zum Zeitpunkt der Messung befindet, hat einen Einfluss auf die gemessenen Werte: die mechanischen Eigenschaften des Substrats reflektieren in die Probe hinein [145]. Um diesen Effekt zu verringern könnten sehr scharfe Spitzen verwendet werden, die gleichzeitig ein hohes Aspektverhältnis aufweisen. Jedoch steigt dann auch die Wahrscheinlichkeit, die Zellen während der Messung zu schädigen. Damit mehrere Messungen an derselben Stelle nacheinander möglich sind, wurden solche Spitzen hier nicht verwendet. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor ist die Deformation der Zelle am Eindringpunkt: der gemessene Elastizitätsmodul hat dadurch immer auch Beiträge aus benachbarten Bereichen.

Eukaryotische Zellen, wie die hier verwendeten, sind immer von einer semipermeablen Membran umgeben, die sie von der Umgebung abschließt und das Zytoplasma im Inneren hält. Diese Membran muss flexibel sein, aber auch widerstandsfähig gegen mechanische Einflüsse von außen. Eine solche Membran besteht aus einer Doppellipidschicht, die integrale und periphere Membranproteine enthält. Integrale Membranproteine durchspannen die Membran und ermöglichen es anderen Proteinen von außen in das Innere der Zelle zu gelangen. Transmembranproteine können lateral in der Zellmembran akkumulieren und so Ionenpumpen, Kanäle oder Rezeptoren formen. Da die Phospholipide ihre Positionen wechseln können, sind auch integrale Membranproteine nicht an einen festen Ort gebunden. Dieses Verhalten wird im „Fluid-Mosaik-Membranmodell“ beschrieben [146]. Mikrodomänen aus Lipiden, Proteinen und Cholesterin formen dynamische Strukturen, die innerhalb der Membran mobil sind und andere mechanische Eigenschaften aufweisen als die umgebende Membran. Diese Strukturen werden auch als „Lipid Rafts“ bezeichnet [147]. Auf der Außenseite der Zellmembran liegt die Glykokalyx, die aus Glykosyl-Resten und herausragenden Proteinen besteht und wichtig für die Verbindung zwischen den Zellen ist. Das Zellskelett liegt direkt unterhalb der Zellmembran. Diese faserartige Struktur bestimmt die Form der Zelle und hält sie mechanisch stabil. Das Skelett besteht im Wesentlichen aus den folgenden Komponenten:

- den Mikrotubuli, röhrenartigen Strukturen mit einem Durchmesser von circa 25 nm. Sie sind am Zellteilungsprozess beteiligt, bestimmen die Form der Zelle und dienen als Transportwege für Vesikel, die Stoffe innerhalb der Zelle transportieren. Die Mikrotubuli breiten sich radial vom Zentrosom her aus, dem Mikrotubuli-Organisations-Zentrum
- den Aktinfilamenten, dünnen, faserartigen Strukturen, die als mechanische Stütze für die Zellmembran dienen und zusammen mit dem Myosin für die Bewegung der Zelle verantwortlich sind.
- den Intermediärfilamenten, dehnbaren Proteinen die in einer hierarchischen Struktur orientiert sind und die Zelle mechanisch verstärken

Die Struktur des Zellskeletts ist in den hier gezeigten Messungen unterhalb und in der Umgebung der Zellmembran klar erkennbar: ein faserartiges Netzwerk mit höherem Elastizitätsmodul. In den Abbildungen der Topografie zeigen sich sehr unterschiedlich geformte Objekte auf der Oberfläche. Einige davon wirken als Eindringpunkte für die Spitze des Biegebalkens. An diesen Stellen ist die maximale Eindringtiefe ebenfalls erhöht. Bei diesen Stellen handelt es sich vermutlich um Transmembranproteine, also für den Stofftransport zuständige Kanäle. Deswegen zeigen diese Stellen eine signifikant andere mechanische Nachgiebigkeit.

Ein anderer Strukturtyp zeichnet sich durch scheibenförmige Objekte aus, die aus der Zelloberfläche herausstehen. Insbesondere aufgrund ihrer Abmessungen könnte es sich bei diesen Objekten um cholesterinreiche Mikrodomänen (= „Lipid Rafts“) handeln. Diese können in der Zellmembran diffundieren und ihren Platz wechseln. Cholesterin trägt dazu bei, die Beweglichkeit der Membran bei unterschiedlichen physiologischen Bedingungen zu erhalten. Die hier gezeigten Messungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt, also bei geringerer als der normalen Temperatur für eine Zellkultur. Die cholesterinreichen Mikrodomänen könnten in diesem Fall als weiche Bereiche dienen, die die mittlere Nachgiebigkeit der Membran auch bei Raumtemperatur erhalten.


8.5. Zusammenfassung

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, nanomechanische, tomographische Abbildungen von ganzen, lebenden Zellen *in vitro* zu erstellen.

Durch die lokale Auswertung spektroskopischer, rasterkraftmikroskopischer Messdaten wurde eine bisher nicht berichtete Auflösung, sowohl in der Ebene, als auch in die Tiefe erreicht. Die Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es bestimmte Komponenten in einer Zelle, wie zum Beispiel, die Membran, den Zellkern, die Kernkörperchen oder das Zellskelett, eindeutig zu identifizieren und mechanisch zu charakterisieren. Die lokale und kumulative Auswertung ermöglicht sowohl Einblicke in die Tiefe des oberflächennahen Bereichs der Zelle, und gibt auch Informationen über ihre Oberfläche. Zell-Zell-Verbindungen und ein dreidimensionales, faserartiges Netzwerk des Zellskelettes können nicht nur sichtbar gemacht werden, sondern auch mechanisch charakterisiert. Bemerkenswert ist, dass weichere Bestandteile des Zellinneren unter dem Zellskelett zuverlässig abgebildet werden können, obwohl dieses einen signifikant höheren Elastizitätsmodul aufweist. Beispielsweise können die im Zellkern liegenden Kernkörperchen dargestellt werden. Die hier verwendete Methode ermöglicht es außerdem, Komponenten der Zellmembran darzustellen und zu identifizieren.

Mit wesentlich höheren Abbildungsraten wäre es möglich, dynamische Prozesse der Zellen nanomechanisch in Echtzeit darstellen zu können. Vorgänge wie zum Beispiel die Zellteilung könnten so auch mechanisch erfasst werden. Aus verschiedenen Gründen ist die Abbildungsrate aber begrenzt. Zum einen durch die Dynamik des Biegebalkens: überschreitet die Frequenz, mit der die Kraft-Abstands Kurven aufgenommen werden, einen bestimmten Grenzwert, so treten hydrodynamische Komponenten in den Kurven auf [148]. Damit diese Komponenten noch vernachlässigbar sind, sollte die Kurvenrate höchstens $1/50$ der fundamentalen Eigenfrequenz des Biegebalkens [148] betragen. In diesem Fall bedeutet das, dass bei circa 100 Kurven pro Sekunde die fundamentale Geschwindigkeitsgrenze liegt. Um diese Grenze anzuheben müssten Biegebalken mit einer größeren Eigenfrequenz verwendet werden. Diese haben aber meistens auch eine höhere Federkonstante, was das Erfassen von sehr weichen Materialien erschwert. Eine Lösung dafür wären sehr kurze Biegebalken: diese können gleichzeitig eine weiche Federkonstante und eine hohe Resonanzfrequenz besitzen. Allerdings ist deren Geometrie sehr ungünstig, um eine auf einer Topografie abzubilden, die große Höhenunterschiede aufweist, wie menschliche Zellen.

Eine zweite Begrenzung ist die Datenerfassungsrate: Um eine sinnvolle Tiefenauflösung zu erhalten, muss die Datenerfassungsrate groß genug sein. Das ist aber durch den Messaufbau gegeben und nur mit sehr großem technischem Aufwand zu verändern. So



ist es manchmal notwendig, die Abbildungen auf kleine Bereiche zu begrenzen und lokale Bereiche auf den Zellen zu studieren.

9. Zusammenfassung

Das Rasterkraftmikroskop ist ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung von Strukturen in der „Nanowelt“ (siehe Kapitel 1). Entwickelt aus dem Raster-Tunnelmikroskop in den 1980er Jahren, kann mit dem Rasterkraftmikroskop heute viel mehr dargestellt werden, als nur die Topografie einer Probenoberfläche mit atomarer Genauigkeit (siehe Kapitel 2).

Neu ist die Möglichkeit eine weiche Probe nicht nur mechanisch zu charakterisieren, sondern diese Nanomechanik auch dreidimensional im oberflächennahen Volumen der Probe abzubilden. Dieser oberflächennahe Bereich ist sowohl beeinflusst von Eigenschaften der Oberfläche, die der Umgebung ausgesetzt ist, wie auch dem Volumen. In diesem Bereich finden zum Beispiel wichtige Transportprozesse in lebenden Zellen statt.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, wie mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie Strukturen unterhalb der Probenoberfläche sichtbar gemacht werden können.

Zwei unterschiedliche Wege aus der dynamischen und quasistatischen Rasterkraftmikroskopie wurden dazu in dieser Arbeit vorgestellt (siehe Kapitel 3): die gleichzeitige Anregung des Biegebalkens mit mehr als einer resonanten Schwingung („multimodale Rasterkraftmikroskopie“) ermöglicht es kurz- und langreichweitige Wechselwirkungen voneinander zu trennen. Wechselwirkungen mit langer Reichweite können genutzt werden, um Strukturen der Probe sichtbar zu machen, die unter der Oberfläche verborgen liegen. Eine andere Möglichkeit ist die spezielle, lokale Auswertung von Kraft-Abstands Kurven. Durch diese lokale Auswertung der Kurven kann die Struktur der Probe unterhalb der Oberfläche unabhängig von der Art der Wechselwirkung, basierend auf der mechanischen Heterogenität, sichtbar gemacht werden. Diese Methode ist allerdings wesentlich langsamer und datenintensiver, als die „normale“ Variante, die die Schwingung mit mehreren Frequenzen nutzt, jedoch kann so eine echte dreidimensionale Abbildung des oberflächennahen Bereichs der Probe erstellt werden.

Anhand von verschiedenen Beispielen wurden die Vor- und Nachteile der jeweiligen Methode demonstriert und verglichen. Die dynamische Rasterkraftmikroskopie ist besonders geeignet um sehr hohe Auflösungen bei gleichzeitig kurzer Abbildungsdauer zu ermöglichen. Damit konnte das Aggregationsverhalten von magnetischen Nanopartikeln in Abhängigkeit von ihrer Größe untersucht werden (siehe Kapitel 4.2): unterhalb

einer bestimmten Größe ordnen sich diese Nanopartikel zufällig und getrieben von der Diffusion auf der Oberfläche. Größere Nanopartikel lagern sich auch ohne äußeres Magnetfeld zu kettenartigen Aggregaten zusammen: sie wirken als kleine Magnete, die sich entsprechend ihrer magnetischen Pole ordnen. Eine Materialunterscheidung ist mit dieser Methode der Rasterkraftmikroskopie ebenfalls möglich: zwei unterschiedliche Polymere wurden dazu untersucht. Mittels Phasenkontrastmikroskopie konnte das Kristallisationsverhalten von Polyethylenglycol untersucht werden (siehe Kapitel 4.3). Wenn sich das Polymer während der Kristallisation in einem begrenzten Raum befindet, entstehen konzentrische Strukturen, die an die Wachstumsringe eines Baums erinnern. Mittels multimodaler Rasterkraftmikroskopie ist nicht nur eine einfache Unterscheidung von Materialien in der grafischen Darstellung möglich, sondern auch eine Unterscheidung in Bezug auf die mechanischen Eigenschaften (siehe Kapitel 4.4). Hier konnten die beiden Phasen des Polystyrol-Butadien-Copolymeren abgebildet und mechanisch quantifiziert werden. Um die Möglichkeit zu demonstrieren, Strukturen unterhalb einer Oberfläche sichtbar zu machen, wurde eine magnetische Festplatte untersucht (siehe Kapitel 4.5). Eine solche Festplatte ist ein mehrschichtiges System: die magnetisch gespeicherten Informationen befinden sich unterhalb mehrerer Schutzschichten und können nicht aus der Topografie erhalten werden. Die multimodale Rasterkraftmikroskopie ist jedoch in der Lage die magnetische Information unter der Oberfläche orts aufgelöst darzustellen.

Ferritin, ein Protein, das im menschlichen Organismus Eisen speichert und am Sauerstofftransport beteiligt ist, wurde mit den beiden vorgestellten rasterkraftmikroskopischen Methoden untersucht. Es besteht aus einer Proteinhülle, die einen Eisenkern in sich trägt. Mittels multimodaler Rasterkraftmikroskopie konnte die Hülle und der Kern in einer einzigen Messung getrennt voneinander abgebildet werden (siehe Kapitel 5). Eine dreizählige Symmetrie der Proteinhülle wurde identifiziert und der Kern als eine polygone Struktur erkannt. Quasistatische Rasterkraftmikroskopie hat es ermöglicht, den Ab- und den Aufbau der Proteinhülle als Funktion des pH-Werts der umgebenden Lösung als Änderung der Höhe der Teilchen darzustellen (siehe Kapitel 6). Bei saurem pH-Wert baut sich die Proteinhülle ab. Wird der pH-Wert anschließend wieder basisch, so baut sich die Proteinhülle selbstorganisiert wieder auf. Dieser Mechanismus kann genutzt werden, um gezielt Stoffe in die Ferritinnanoteilchen einzukapseln und freizusetzen und die Nanoteilchen als Transportbehälter zu nutzen.

Wird bei der quasistatischen Rasterkraftmikroskopie an jedem Punkt die gemessene Kraft-Abstands Kurve vollständig aufgezeichnet, so lassen sich neben der Topografie der Probe noch eine Reihe weiterer Größen extrahieren (vergleiche Kapitel 3.2). Anhand von Messungen an lebenden gesunden menschlichen Zellen und Krebszellen des Epithels der Brust wurde demonstriert, dass mit quasistatischer Rasterkraftmikroskopie die mechanischen Eigenschaften lokal abgebildet werden können, und so auch innere Strukturen der Zellen sichtbar gemacht werden können (siehe Kapitel 7). Kombinierte rasterkraft- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigen diese Fähigkeit und lassen Zellbestandteile wie Zellskelett und Zellkern klar unterscheidbar auftreten.

Eine besondere Methode der Auswertung der gemessenen Kraft-Abstands Kurven ermöglicht es, ein dreidimensionales Abbild der mechanischen Eigenschaften der menschlichen Zellen darzustellen (siehe Kapitel 8). Dazu werden die Kurven unter Zuhilfenahme Hertzscher Kontaktmechanik in Bezug auf die Eindringtiefe in die Probe lokal ausgewertet. Dadurch entstehen schichtweise Karten, mit denen in die Tiefe der Probe „gesehen“ werden kann. Die Untersuchungen der menschlichen Zellen zeigen insbesondere zwei bemerkenswerte Details: die Zellen sind von einer Schicht umgeben, die mechanisch härter ist, als das Zellinnere. Gleichzeitig existieren in dieser Schicht Stellen, in denen es besonders einfach ist, tief in die Zelle einzudringen. Vermutlich handelt es sich bei diesen weichen Stellen um die Lage von Proteinen, die die Zellmembran ganz durchspannen und von der Zelle zum Stoffaustausch genutzt werden.

10.1. Abbildungsgeschwindigkeit und Auflösung

Die quasistatische Rasterkraftmikroskopie ist besonders geeignet, um auch sehr weiche Materialien vermessen zu können, die mit „normalen“ rasterkraftmikroskopischen Methoden nicht gemessen werden können, weil dort die Regelung nicht zuverlässig funktioniert (siehe auch Kapitel 4.1). Der große Vorteil der „normalen“ Methoden, die hohe Abbildungsgeschwindigkeit und hohe Auflösung, konnte in diesem Maße nicht bei der quasistatischen Rasterkraftmikroskopie realisiert werden. Die Grenze liegt momentan nicht in der Dynamik der Schwingung des Biegebalkens: beim so genannten „PeakForce-Tapping“ (Bruker) werden üblicherweise zweitausend Kurven pro Sekunde durchgeführt – das entspricht dem 20-fachen der in dieser Arbeit verwendeten Messgeschwindigkeit. Jedoch wird die gemessene Kraft-Abstands Kurve zum einen mit einer sehr geringen Auflösung aufgezeichnet (weniger als einhundert Datenpunkte pro Zyklus) und zum anderen sofort wieder verworfen, wenn die kumulativen Parameter extrahiert worden sind. Es ist also nicht möglich eine lokale Auswertung zum Beispiel des E-Moduls mit dieser Methode zu realisieren. Eine höhere Datenerfassungsrate würde dieses Problem lösen. Das ist technisch möglich: die in dieser Arbeit verwendete Phasenregelschleife HF2PLL (Zürich) kann 210 Millionen Datenpunkte pro Sekunde aus einem analogen Signal (hier: Verbiegung des Biegebalkens) konvertieren und speichern. Die in dieser Arbeit verwendeten Rasterkraftmikroskope ermöglichen 16 tausend Datenpunkte pro Sekunde. Das bedeutet, eine theoretische Vergrößerung der Abbildungsgeschwindigkeit bzw. der Auflösung um den Faktor 13000 wäre möglich – das ist mehr, als die Dynamik der Schwingung des Biegebalkens zulässt [148], bedeutet aber, dass eine ähnliche Abbildungsgeschwindigkeit wie bei der Verwendung des „PeakForce-Tapping“ möglich ist. Die erhaltene Datenmenge ist dementsprechend groß und deren Bearbeitung zeitraubend. Eine typische Messung aus dieser Arbeit hat eine tatsächliche Datenmenge von circa 4 GB und die rechnerische Auswertung der Daten zu generierten Abbildungen dauert circa 5 Stunden. Eine Messung mit den optimalen Parametern, oder eine Messreihe, hätte demnach eine Größe von 80 bis 100 GB und die Auswertung würde circa 4 Tage in Anspruch nehmen. Diese lange Zeitspanne macht ein kontinuierliches Experimentieren unmöglich. Zur Auswertung der Daten sollte in diesen Fällen

ein Hochleistungsrechner verwendet werden, um Experimente auch weiterhin in sinnvollen Zeitabständen auswerten und planen zu können.

10.2. Anwendungsvorschlag für diese Methode

Durch die höhere räumliche Auflösung wird es möglich beispielsweise in biologischen Zellen feinere Strukturen zu unterscheiden, wie die unterschiedlichen Bestandteile des Zellskelets. Durch die höheren Abbildungsraten können dynamische Vorgänge sichtbar gemacht werden.

Ein Beispiel für solche „dynamischen Vorgänge“ in Zellen könnte das Eindringen von Nanopartikeln in den Zellinnenraum sein. Zellen kommen mit solchen Nanopartikeln nicht nur unfreiwillig in Berührung (siehe Kapitel 1), sondern werden auch gezielt als pharmakologisches Mittel in der Krebstherapie eingesetzt [7-10, 103, 149, 150]. Nanopartikel gelangen wesentlich effizienter an die Stelle, an der das Medikament seine Wirkung entfalten soll [151], da gerade dort, wo ein Tumor wächst, die Nanopartikel die Blutbahn verlassen können (der so genannte „EPR-Effekt“ [152]). Um Vorgänge zu untersuchen, die zwischen den Nanopartikeln und dem umgebenden Gewebe, aber auch die Wechselwirkungen zwischen gesundem und erkranktem Gewebe ablaufen und gleichzeitig die physikalischen Eigenschaften der Nanopartikel zu bestimmen, ist ein geeignetes Werkzeug notwendig [103]. Eine Rasterkraftmikroskopie, wie sie hier vorgeschlagen worden ist (siehe 10.1) kann diese Anforderungen erfüllen und einen Beitrag dazu leisten, das Geschehen in dieser gezielten Pharmakotherapie besser zu verstehen.

10.3. Kombination mit anderen Methoden

Um noch spezifischere Informationen aus dem Inneren von lebenden biologischen Zellen zu erhalten, kann die Rasterkraftmikroskopie mit anderen Methoden kombiniert werden. Mit Fluoreszenzmikroskopie werden biologische Materialien seit vielen Jahren umfangreich untersucht [153]. Aussehen und Struktur von Zellorganellen sind sehr gut bekannt. Eine Kombination von Fluoreszenz- und Rasterkraftmikroskopie (unterhalb der Oberfläche) ermöglicht es, die noch unbekannten Strukturen aus der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung mit den bekannten Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie zu referenzieren. Werden stochastische optische Methoden [154] oder multi-

photonen Mikroskopiemethoden [155] verwendet, so kann die Referenzierung noch genauer und insbesondere auch tiefenaufgelöst erfolgen. Die quasistatische Rasterkraftmikroskopie kann mit der dynamischen Rasterkraftmikroskopie kombiniert werden, wenn der Biegebalken zu einer Schwingung angeregt wird, deren Amplitude klein im Vergleich zur gemessenen Kraft-Abstands Kurve ist. Wird der Biegebalken zu einer torsionalen Schwingung angeregt, so kann diese genutzt werden, um Wechselwirkungen in der Probenebene zu detektieren [156, 157].

So könnte sich die dreidimensionale Rasterkraftmikroskopie zu einem Standardverfahren in der nanomechanischen Untersuchung biologischer Materialien entwickeln.

Folgende Teile dieser Arbeit wurden vorab in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht:

1. **Stühn, Lukas**; Fritschen, Anna; Choy, Joseph; Dehnert, Martin; Dietz, Christian:
Nanomechanical sub-surface mapping of living biological cells by force microscopy.
[Online-Edition: <https://doi.org/10.1039/C9NR03497H>]
In: Nanoscale, ISSN 2040-3364, (2019)
2. **Stühn, Lukas**; Auernhammer, Julia; Dietz, Christian:
pH-depended protein shell dis- and reassembly of ferritin nanoparticles revealed by atomic force microscopy.
[Online-Edition: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53943-3>]
In: Scientific Reports, 2019, (1), ISSN 2045-2322, (2019)
3. Amiri, Anahid; Hastert, Florian D.; **Stühn, Lukas**; Dietz, Christian:
Structural Analysis of Healthy and Cancerous Epithelial Breast Type Cells by Nanomechanical Spectroscopy Allows to Obtain Peculiarities of Skeleton and Junctions.
[Online-Edition: <https://doi.org/10.1039/C9NA00021F>]
In: Nanoscale Advances, ISSN 2516-0230, (2019)
4. Grefe, Ann-Kathrin; Kuttich, Björn; **Stühn, Lukas**; Stark, Robert; Stühn, Bernd:
Oriented crystallization of PEG induced by confinement in cylindrical nanopores: Structural and thermal properties.
[Online-Edition: <https://doi.org/10.1039/C9SM00053D>]
In: Soft Matter ISSN 1744-683X, (2019)
5. Appel, Christian; Kuttich, Björn; **Stühn, Lukas**; Stark, Robert W.; Stühn, Bernd:
Structural Properties and Magnetic Ordering in 2D Polymer Nanocomposites: Existence of Long Magnetic Dipolar Chains in Zero Field
[Online-Edition: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02094>]
In: Langmuir, ISSN 0743-7463, (2019)

Weitere Veröffentlichung:

6. Auernhammer, Julia; Bell, Alena K.; Schulze, Marcus; Du, Yue; [Stühn, Lukas](#); Wendenburg, Sonja; Pause, Isabelle; Biesalski, Markus; Ensinger, Wolfgang; Stark, Robert W.: **Comprehensive investigation of a water-repelling polymer coating for cellulose-based samples by a direct comparison of un- and modified fibres.**

In Druck bei: Cellulose, ISSN 1572-882X, (2021) DOI: 10.1007/s10570-020-03675-9

1. **Lukas Stühn*** und Christian Dietz
„Subsurface Imaging“ of magnetic nanoparticles and quantification of nanomechanical properties of polymers and biological materials by bimodal atomic force microscopy."
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Würzburg, Nov. 2017 (upgraded poster)
2. **Lukas Stühn***, Julia Auernhammer, Anna Fritschen, Felix Nagler und Christian Dietz
Subsurface imaging of magnetic nanoparticles and measurement of nanomechanical properties of polymers and biological materials by bimodal atomic force microscopy
DPG-Frühjahrstagung der Sektion Kondensierte Materie, Mrz. 2018, Berlin
3. **Lukas Stühn***, Julia Auernhammer und Christian Dietz
In situ observation of the pH-dependent dis- and reassembly process of ferritin nanoparticles by atomic force microscopy
7th Multifrequency AFM Conference, Apr. 2018, Madrid
4. **Lukas Stühn**, Anna Fritschen und Christian Dietz*
„Nanomechanical sub-surface mapping of cells by atomic force microscopy“
21st annual Linz winter workshop – Advances in single-molecule research for biology and nanoscience, Linz, Feb. 2019
5. **Lukas Stühn***, Anna Fritschen, und Christian Dietz
Nanomechanical sub-surface mapping of cells by atomic force microscopy
DPG-Frühjahrstagung der Sektion Kondensierte Materie, Mrz. 2019, Regensburg

* präsentierender Autor

Betreute Arbeiten und Dank

Vielen Dank an die Arbeitsgruppe „Physik der Oberflächen“! Insbesondere vielen Dank an **Christian Dietz** für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und an **Prof. Robert Stark** für die Möglichkeit dieses Projekt in seiner Gruppe mit erstklassiger Ausstattung durchführen zu können.

Vielen Dank an **Martin Dehnert** aus der Gruppe „Chemische Physik II“ der TU Chemnitz für die Bereitstellung des Matlab-Skripts zur Auswertung der Kraft-Abstands Kurven und die Bereitschaft zur ständigen Diskussion und dem ständigen Austausch und dadurch der Verbesserung der Auswertungen und Möglichkeiten der Software.

Für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung des magnetischen Verhaltens von Nanopartikeln mit Rasterkraftmikroskopie und Röntgenstreuung vielen Dank an **Christian Appel** und **Björn Kuttich** aus der Gruppe „Experimentelle Physik kondensierter Materie“ an der TU Darmstadt.

Vielen Dank an **Ann-Kathrin Grefe** aus der Gruppe „Experimentelle Physik kondensierter Materie“ an der TU Darmstadt für die Zusammenarbeit am Thema des Kristallisationsverhaltens von Polymeren in begrenzten Räumen.

Für die rasterkraftmikroskopischen Messungen an Ferritinteilchen bei unterschiedlichen pH-Werten im Rahmen ihrer Masterarbeit vielen Dank an **Julia Auernhammer**.

Die Messungen an lebenden Zellen mit quasistatischer Rasterkraftmikroskopie wurden von **Anahid Amiri** im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt, dafür vielen Dank.

Vielen Dank an verschiedene Studierende und Schüler, deren **(Abschluss-)Arbeiten** ich betreuen durfte, und die dadurch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: **Alexander** Josefson (Ferien im Labor „FiL“), **Alisa** Bellon (Forschungspraktikum), **Anahid** Amiri (Forschungspraktikum und Masterarbeit), **Anna** Fritschen (Bachelor- und Masterarbeit), **Christian** Rust (Masterarbeit), **Christoph** Reimuth (Masterarbeit), **Felix**

Nagler (Bachelorarbeit), **Johanna** Boywitt (FiL), **Jonas** Galka (FiL), **Jonatan** Fratz (Erfinderlabor „ErLab“), **Joseph** Choy (internationales Forschungspraktikum), **Julia** Auerhammer (Forschungspraktikum und Masterarbeit), **Julia** Koldau (ErLab), **Kim** Mentchen (Bachelorarbeit), **Laura** Bradschettl (ErLab), **Marvin** (ErLab), **Matthias** Mahr (Forschungspraktikum), **Nicola** Kochler (FiL), **Oliver** Maaß (FiL), **Peby** Damayanti (Forschungspraktikum), **Pei** Zhou (Forschungspraktikum), **Sarina** Paulus (Bachelorarbeit), **Stefanie** Mrozinski (FiL).

Zu guter Letzt: für die Finanzierung dieses Projektes vielen Dank an die **Deutsche Forschungsgemeinschaft**, Sachbeihilfe Projektnummer 318205773.

Akademischer Lebenslauf

von Lukas Stühn aus Freiburg

2016-2020

Promotion in Materialwissenschaften (Dr. rer. nat.), TU Darmstadt

Doktorarbeit: „Oberflächennahe Tomografie der Nanomechanik polymerer und biologischer Materialien mit Rasterkraftmikroskopie“

2012-2015

Studium Materials Science (MSc), TU Darmstadt

Abschlussarbeit: “Mechanical manipulation of polystyrene nanospheres with the atomic force microscope”

2008-2012

Studium der Materialwissenschaften (BSc), TU Darmstadt

Abschlussarbeit: „Synthese und Charakterisierung eines arsenfreien Eisen-Pniktid Supraleiters“

Monomodale frequenzmodulierte Rasterkraftmikroskopie

In diesem Abschnitt wird das Vorgehen beschrieben, um eine externe, frequenzmodulierte Anregung in einem „Cypher“ Rasterkraftmikroskop und einem Zürich HF2PLL zu erreichen.

1. Verbinden der Kabel

Kabelverbindungen zwischen dem PLL, dem „Backpack“ des AFM und dem Controller des AFM und dem Oszilloskop:

PLL.SignalInput1.+In <-> Controller.Input.1

PLL.SignalOutput1.Add <-> PLL.Aux4

PLL.SignalOutput1.Out <-> Backpack.Input.0

PLL.Aux1 <-> Controller.Input.1

Oszilloskop.CH1 <-> Controller.Output.0

Oszilloskop.CH2 <-> Backpack.Output.0

2. Konfiguration der AR-AFM-Software

Messmodus auf „contact“ stellen.

Im Menü „CrosspointPanel“ folgende Einstellungen verändern:

BNCOut0 <- BNCIn1 (zur Ausgabe auf dem Oszilloskop)

bdDrive <- BNCIn0 (Anregung des PLL wird auf den blueDrive gegeben)

InFast <- BNCIn1 (Ablenkung wird für den z-Piezo zur Verarbeitung gegeben)

BNCOut0 <- ACDefl (zur Ausgabe auf dem Oszilloskop)

Das „Schloss“ „no Auto change crosspoint“ schließen, alle Einstellungen gültig machen durch „Write Crosspoint“

Im Menü „Alias Panel“ folgende Einstellungen vornehmen:

In der Registerkarte „Dynamic“ in der Zeile „Deflection“ den Wert auf „Input.Fast“ ändern. Durch klicken auf „Write“ setzen. In der Registerkarte „All“ durch klicken auf „Read“ überprüfen, ob der Wert wirklich gesetzt wurde.

3. Einstellungen in der PLL-Software

Ausgeben einer sin-Funktion einer bestimmten Frequenz und Amplitude, sowie locken des Referenzsignals auf das Messsignal.

In der Registerkarte „Lock-in“ unten den „Sweeper“ benutzen: im Bereich der vermuteten Resonanzfrequenz suchen lassen. Cursor an die entsprechende Stelle verschieben, die Frequenz kopieren und bei Ch1.Frequency.Freq eintragen. Die mit dem Cursor gefundene Phase unter Ch1.Frequency.Phaseshift eintragen.

Unter SignalInputs.AC einschalten.

Annähern an die Oberfläche im externen FM-Modus

Hier wird das Vorgehen beschrieben, das zum Durchführen des Annäherungsvorgangs aus Kapitel 4.1 benötigt wird.

0. Methode auf “contact”, in CrosspointPanel bddrive und input.fast auf BncIn0 setzen, im AliasTab Deflection auf Input.Fast setzen
1. Fokus auf Probe -> Wert speichern
2. Fokus auf Cantilever -> Wert speichern
3. “Move to Pre-Engage”
Achtung (in Wasser):
Fokusring auf “2”
Brechungsindex in Einstellungen auf “water”
“Pre-Engage height” auf 100 μm
4. Resonanzfrequenz und Phase an PLL finden, Amplitude wählen

-
5. Schwingung starten (in Resonanz), Amplitudenkontrolle starten, PLL starten
(auf Resonanz und mit Phase als Setpoint)
 6. Für Setpoint von AFM selben Wert wie bei Deflection wählen
 7. “engage” -> Z Voltage
Bewegt sich zu positiven Werten
Bewegt sich zu negativen Werten -> Setpoint erhöhen
 8. “centre” am PLL wählen um neue Frequenz zu setzten, wiederholen bis OF gefunden ist

- Abbildung 1** Die Quader bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl an Teilwürfeln. Je kleiner die Anzahl an Teilwürfeln ist, desto größer ist die Anzahl der Würfel, die an der Oberfläche sitzen, im Vergleich zu denen im Volumen. 8
- Abbildung 2** Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops. Der allgemeine Aufbau ist in a) gezeigt. Die Oberfläche einer Probe wird mit einer an einen Biegebalken befestigten Spitze abgerastert. Die Bewegung der Spitze erfolgt mittels einer Rastereinheit, meist einem Piezoaktuator. Die Auslenkung des Biegebalkens wird durch einen Lichtzeiger in einer segmentierten Photodiode detektiert. Der Lichtweg und wesentliche Größen zur Ermittlung der Vergrößerung können aus Abbildungsteil b) gelesen werden. Hier sind der Winkel δ und die Länge s_1 die Verbiegung des Biegebalkens, s_2 die Auslenkung gemessen an der Photodiode, l die Länge des Biegebalkens und d die Länge des Lichtwegs von der Rückseite des Biegebalkens bis zur Photodiode. 13
- Abbildung 3** Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probenoberfläche und Messregime der Rasterkraftmikroskopie. (a) zeigt den Verlauf der wirkenden Nettokraft und die sich daraus ergebenden Messregime bzw. Betriebsmodi des Rasterkraftmikroskops (siehe auch Abschnitte 2.3, 2.4, 2.5). (b) Verdeutlicht die Reichweite und Lage der jeweiligen Wechselwirkung (erstellt nach einer Idee in: [42]). 16
- Abbildung 4** Artefakte durch die Messspitze bei der Rasterkraftmikroskopie. Die Topografie der orangenen Objekte soll abgebildet werden, die gemessene Topografie ist als grüne Linie dargestellt. Bei optimaler Geometrie und optimalem Regelkreis (a) wird die Topografie der Oberfläche fast exakt wiedergegeben. Die Geometrie der Spitze (b) verhindert eine exakte Abbildung von Kanten, insbesondere wenn die Spitze einen großen Öffnungswinkel aufweist. 18
- Abbildung 5** Verlauf der Amplitude A und Phasenverschiebung ϕ in Abhängigkeit der Frequenz. Die durchgezogenen Linien beschreiben den Verlauf der Amplitude und der Phase für den kraftfreien Fall, die gestrichelten Linien jeweils unter dem Einwirken attraktiver (kurze Striche) oder repulsiver (lange Striche) Kräfte. Die Resonanzfrequenz f_0 verschiebt sich zu kleineren Werten $f_{\text{attraktiv}}$, wenn attraktive Kräfte auf die Spitze einwirken und zu größeren Werten f_{repulsiv} , wenn repulsive Kräfte auf die Spitze einwirken. Wird der Biegebalken bei einer konstanten Frequenz (f_0) zum Schwingen mit der Amplitude A_0 angeregt, so vermindert sich seine Schwingungsamplitude, wenn attraktive oder repulsive Kräfte auf die Spitze einwirken auf $A_{\text{attraktiv}}$ oder A_{repulsiv} . Für sehr kleine Frequenzen vermindert sich die Amplitude im Grenzfall auf die Anregungsamplitude A_{Anregung} . Die Kurve für die Phasenverschiebung bewegt sich jeweils mit der Resonanzfrequenz, daraus resultiert eine Änderung der Phasenverschiebung bei Einwirkung von externen Kräften. 22
- Abbildung 6** Schematischer Verlauf einer Kraft-Abstands Kurve. Die durchgezogene grüne Linie stellt die Hinfahrkurve dar, die gestrichelte grüne Linie die

Rückfahrkurve. Die Variablen bedeuten: F_0 – Wert für die Kraft in der Ruhelage, F_{min} – niedrigster Wert für die Kraft bei maximaler Adhäsion, $|F_{Adh}|$ – Adhäsionskraft, Kraft die nötig ist, um Spitze und Probenoberfläche zu separieren, h_{soll} – Position der Spitze bei Erreichen des Kraftsollwerts, h_{KP} – Position der Spitze bei Erreichen des Kontaktpunkts (Definition des KP s.u. im Text), $|h_{sep}|$ – Distanz bis zur Separation von Spitze und Probenoberfläche, h_{trenn} – Position der Spitze bei Trennung von der Probenoberfläche, $|h_{Eind}|$ – maximale Eindringtiefe in die Probe. Die gestrichelten schwarzen Linien deuten die projizierten Positionen der entsprechenden Variablen auf den Achsen an. Die in Kreisen dargestellten Positionen 1 bis 10 deuten besondere Stellen im Verlauf der Kurve an und werden im Text genauer erläutert. 24

Abbildung 7 Schematische Darstellung verschiedener Kraft-Abstands Kurven unter unterschiedlichen Bedingungen. Es ist jeweils die Kraft F über die Position der Spitze des Biegebalkens h aufgetragen. Unterschiedliches Verhalten der Probe und insbesondere in der Wechselwirkung zwischen Probe und Spitze wird in a-f dargestellt: a) – harte Probe, b) – weiche Probe, c) – mit „snap into contact“, d) – mit Adhäsion, e) – durch mehrere Schichten und f) – mit Molekülfaltung.... 26

Abbildung 8 Leistungsdichtespektrum eines rechteckigen Biegebalkens. Auftretende vertikale („normale“) Schwingungsfrequenzen eines rechteckigen Biegebalkens unter thermischem Rauschen. Messung bei Raumtemperatur und an Luft. Biegebalken Bruker MESP-HM-V2, Herstellerangaben: $f_{01}=75$ kHz, $k=3,0$ N/m. 32

Abbildung 9 Bimodale Rasterkraftmikroskopie: die Überlagerung der ersten und der zweiten Eigenfrequenz des Biegebalkens bei der Anregung führt zu einem typischen, resultierenden Signal. Die unterschiedlichen „Aufenthaltsdauern“ der beiden Schwingungen in der Nähe der Probenoberfläche führen zu unterschiedlichen Sensitivitäten in Bezug auf lang- und kurzreichweitige Kräfte: die erste Eigenschwingung ist insbesondere für kurzreichweitige Kräfte sensitiv, die zweite Eigenschwingung insbesondere für langreichweitige Kräfte, wie magnetische Wechselwirkungen. 34

Abbildung 10 Die lokale Auswertung von Kraft-Abstands Kurven durch stückweise lineare Interpolation ermöglicht es eine Probe auch unterhalb der Oberfläche mechanisch zu charakterisieren. Das Schrittweise Vorgehen, um diese Daten zu erhalten, ist hier schematisch dargestellt. Zusätzlich zu den in erläuterten Größen können mit dieser Methode auch lokale Größen ausgewertet werden, wie dE_{lok}/dh die lokale Änderung des Elastizitätsmoduls und E_{lok} der absolute, lokale Wert des Elastizitätsmoduls. 36

Abbildung 11 Eine Messspitze durchdringt (a) oder drückt (b) auf eine Probe, die aus zwei wechselnden Schichten mit unterschiedlichem Elastizitätsmodul besteht. Der jeweilige Verlauf des Elastizitätsmoduls E ist neben der Teilabbildung dargestellt. Die beiden Varianten stellen Grenzfälle der Möglichkeiten dar, mit denen eine Messspitze und ein Material wechselwirken können. 38

Abbildung 12 Schema des Verlaufs von Frequenz f (orange) und Amplitude A (grün) bei Annäherung der Messspitze an die Probenoberfläche. Bemerkenswert ist der Wechsel des Vorzeichens der Steigung der Frequenz in der Nähe des

Kontaktpunkts. In grauer Farbe und gestrichelt ist der Verlauf der Anregungsspannung U der Schwingung im Fall der Annäherung an die Oberfläche dargestellt. 43

Abbildung 13 Eisenoxid-Nanopartikel in einem Polymerfilm auf einem Silizium-Substrat. Die Nanopartikel in a) haben einen nominellen Radius von 5 nm, die Nanopartikel in b) einen nominellen Radius von 10 nm. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 5 μm . Die Herstellungsmethode für beide Proben ist gleich, jedoch ist die Verteilung der Nanopartikel auf der Probe deutlich unterschiedlich. In c) ist die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Partikelhöhen für beide Proben separat dargestellt. Auffallend ist, dass die kleineren Nanopartikel zwei unterschiedliche Maxima aufweisen, was auf die Ausbildung einer zweiten Schicht hinweist. In d) und e) sind die Nanopartikel aus a) und b) in einer höheraufgelösten Messung dargestellt, sodass die einzelnen Nanopartikel einzeln erkennbar sind. Die Länge des Skalenbalkens beträgt hier 500 nm. 46

Abbildung 14 Doppellogarithmische Darstellung der Oberfläche eines Objekts (Größe in Pixel) in Bezug zum Gyrationradius des Objekts (Länge in Pixel). Die Abbildung a) bezieht sich auf die Nanopartikel mit einem nominellen Radius von 5 nm, Abbildung b) auf die Nanopartikel mit einem nominellen Radius von 10 nm. 47

Abbildung 15 Ungefüllte und gefüllte Löcher in Polycarbonatfolie. a) und b) zeigen die Verteilung dieser Löcher durch die Ionenbestrahlung und deren unterschiedliche Größe durch unterschiedliche Ätzzeiten. In c) und d) ist ein einzelnes, mit PEG gefülltes Loch gezeigt, die Topografie in c) und das Phasensignal – und damit der Materialkontrast – in d). Eine konzentrische Struktur aus amorphen und kristallinen Bereichen ist zu erkennen. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 μm für a) und b), sowie 50 nm für c) und d). 50

Abbildung 16 Bimodale Rasterkraftmikroskopie eines Films Styrol-Butadien-Copolymer. In a) ist die Topografie der Oberfläche dargestellt, b) zeigt das Regelsignal, die Frequenzverschiebung der ersten Eigenfrequenz, in c) wird durch die Frequenzverschiebung der zweiten Eigenfrequenz die Block-Struktur der Probe sichtbar. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 50 nm. In d) ist die Häufigkeitsverteilung (schwarze Linie) der Frequenzverschiebung aus c) dargestellt, sowie der zugehörige E-Modul. Zwei unterschiedliche Gauß-Verteilungen konnten identifiziert werden (grüne Linien), deren Summenkurve ist ebenfalls dargestellt (orangene Linie). Die Maxima dieser Verteilungen liegen bei $x_{c1} = -1335,5 \text{ Hz}$ und $x_{c2} = -1269,8 \text{ Hz}$ 53

Abbildung 17 Magnetische Festplatte eines Computers, gemessen mit bimodaler frequenzmodulierter Rasterkraftmikroskopie. In a) ist die Topografie der Oberfläche der Festplatte dargestellt, b) zeigt das Regelsignal, die Verschiebung der ersten Eigenfrequenz. Der magnetische Kontrast der Festplatte ist in c) und in d) zu sehen. In c) ist der magnetische Kontrast durch die Verschiebung der zweiten Eigenfrequenz und in d) durch das „Regelsignal“ im Fall einer nochmaligen Messung der jeweiligen Zeile in einem Abstand von 30 nm zur Oberfläche (=„klassische“ Messmethode) zu sehen. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 500 nm. 57

- Abbildung 18** Ferritin abgebildet mit bimodaler, magnetischer Rasterkraftmikroskopie. a) bis d) zeigen zweidimensionale Darstellungen verschiedener Observablen, e) und f) eine dreidimensionale Überlagerung von Topografie und Phasensignal. a) zeigt die Amplitude der ersten Eigenmode, b) die der zweiten. c) zeigt die Phase der ersten Eigenmode, d) die der zweiten. In e) ist die Topografie dreidimensional repräsentiert und als Farbcode die Phase der ersten Schwingung überlagert, in f) die der zweiten Schwingung. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 10 nm..... 62
- Abbildung 19** Bimodale magnetische Rasterkraftmikroskopie an einem einzelnen Ferritin Nanoteilchen. Die Detailabbildungen zeigen: a) die Phasenverschiebung der ersten Schwingung, eine polygone Figur aus dem Inneren des Teilchens, b) die Phasenverschiebung der zweiten Schwingung, eine dreizählige Symmetrie der Hülle des Teilchens, c) die Rekonstruktion der Hülle des Teilchens aus Röntgenstreudaten [107], die ebenso eine dreizählige Symmetrie aufweist. 63
- Abbildung 20** Elektrosterische Wechselwirkungen zwischen Messspitze, Ferritin-Nanoteilchen und Substrat bei verschiedenen pH-Werten. 69
- Abbildung 21** Topografie einer Probe mit Ferritinnanoteilchen auf einem Glimmer-Substrat in wässriger Umgebung bei unterschiedlichen pH-Werten. Die Abfolge der eingestellten pH-Werte (und damit auch die zeitliche Abfolge der Messung) ist: a) pH 6, b) pH 2, c) pH 4, d) pH 6, e) pH 8, f) pH 2, g) pH 4 und h) pH 6. Die Nanopartikel sind unterschiedlich gekennzeichnet: Quadrat = verschwindet im nächsten Schritt, Pfeil = neu entstanden und Kreis = während des ganzen Experiments präsent, die unterschiedlichen Größen sind angegeben. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 100 nm..... 71
- Abbildung 22** Topografie einer Probe mit Apoferritinnanoteilchen auf einem Glimmer-Substrat in wässriger Umgebung bei unterschiedlichen pH-Werten. Ein Teilchen ist herausgegriffen und durch einen weißen Kreis markiert. Seine Höhe im jeweiligen Abschnitt des Experiments ist angegeben. Die Abfolge der pH-Werte (und damit auch die zeitliche Abfolge der Messung) ist: a) pH 6, b) pH 2, c) pH 3, d) pH 4 und e) pH 6. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 200 nm. 72
- Abbildung 23** Entwicklung der Höhenverteilung der Apoferritin Nanoteilchen aus **Abbildung 22**. Für jeden Schritt der Messreihe ist die mittlere Höhe der Teilchen angegeben, sowie die Standardabweichung der Verteilung. Zusätzlich zeigt ein Histogramm die Höhenverteilung der Teilchen in jedem Schritt des Experiments. 73
- Abbildung 24** Lebende, menschliche Zellen, abgebildet mit quasistatischer Rasterkraftmikroskopie. In a) und b) ist ein Ausschnitt einer Probe mit BT-20 Krebszellen abgebildet, in c) und d) ist ein Ausschnitt einer Probe mit gesunden HBL-100 Zellen dargestellt. Die Topografie wird jeweils in a) und c) dargestellt, der Regelfehler in b) und in d). Die Länge des Skalenbalkens beträgt 10 μm . Die gelben Vierecke sind mit römischen Ziffern bezeichnet und beziehen sich auf vergrößerte Darstellungen in **Abbildung 25**. Der gelbe Pfeil markiert die Position einer vergrößerten Darstellung in **Abbildung 26**. 78

Abbildung 25 Detailausschnitte aus Abbildung 24 . Die Ziffern I bis IV markieren in Abbildung 24 die Positionen des jeweiligen Ausschnitts. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 μm	79
Abbildung 26 Detailausschnitt der mit einem Pfeil markierten Bereichs in Abbildung 24 d. Die Topografie und der Regelfehler sind dargestellt. Zu erkennen ist ein Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (MTOC, <i>microtubule organizing center</i>). Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 μm	80
Abbildung 27 Optische und rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von zwei lebenden, menschlichen (Krebs-)Zellen des Typs BT-20. Die Abbildungen a) und b) zeigen optische Aufnahmen, a) eine Hellfeldabbildung, b) die mit DAPI fluoreszenzgefärbten Zellkerne. Die Abbildungen c) bis f) zeigen rasterkraftmikroskopische Messergebnisse, in dem in a) und b) durch ein weißes Rechteck gekennzeichneten Ausschnitt. In c) ist die Höhe bei Erreichen der Führungsgröße abgebildet. Die maximale Eindringtiefe der Messspitze in die Probe ist in d) dargestellt. e) zeigt die Höhenposition des Kontaktpunkts und damit die Topografie der Zelloberfläche, der kumulative Elastizitätsmodul ist in f) dargestellt, besondere Stellen sind mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet und im Text erläutert. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 10 μm	87
Abbildung 28 Die Topografie zweier unterschiedlicher Proben lebender, menschlicher Zellen. Einzelne, besondere Stellen sind herausgegriffen und deren Profil der Topografie dargestellt und im Text genauer erläutert. Bild a) entspricht Abbildung 27 e.	89
Abbildung 29 Kumulative Auswertung verschiedener Größen einer rasterkraftmikroskopischen Messung an lebenden menschlichen Zellen. Abbildungsteil a) zeigt die Höhe bei Erreichen der Führungsgröße der Kraft, b) die Topografie (als Position des Kontaktpunkts), in c) die maximale Eindringtiefe der Messspitze in die Probe und in d) den kumulativen E-Modul. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 10 μm . Die gestrichelte Linie deutet die Position der xz-Schnitte in Abbildung 31 an.	90
Abbildung 30 Häufigkeitsverteilung des E-Moduls der Messung aus Abbildung 29 d). Der schwarze Graf zeigt die tatsächliche Verteilung, in grün sind drei Gauß-Verteilungen eingezeichnet, die mit den drei lokalen Maxima des schwarzen Grafen korrespondieren. Der orangene Graf zeigt die Summenkurve der Gauß-Verteilungen.	91
Abbildung 31 Lokale Darstellung der Kraft, der Steigung der Kraft und des E-Moduls als xz-Schnitte in die Tiefe der in Abbildung 29 gezeigten Messung (an der Position der gestrichelten Linie).	93
Abbildung 32 Die Steigung der Kraft, die Kraft und der E-Modul eines Ausschnitts aus der Probe aus Abbildung 27 sind tiefenaufgelöst in verschiedenen Schnitten dargestellt. Die Länge des Skalenbalkens beträgt 1 μm	95
Abbildung 33 Dreidimensionale Darstellung der Tomografie nanomechanischer Eigenschaften lebender menschlicher Zellen. Die Abbildung zeigt die Messdaten	



aus **Abbildung 27** als dreidimensionale Darstellung in Kombination mit optischer Fluoreszenzmikroskopie. Die Topografie der Zelle ist dreidimensional dargestellt, der Farbcode der Oberfläche spiegelt den kumulativen E-Modul in dem jeweiligen Punkt wieder. Der lokale E-Modul in der Tiefe ist mit einer weiteren Farbskala codiert und hier an den Seitenflächen sichtbar. Die zweidimensionale Abbildung im Untergrund ist die Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der gefärbten Zellkerne der Probe an dieser Stelle. 96

Abbildung 34 Schnitt in die Tiefe der Probe an der mit einer gestrichelten Linie markierten Stelle in **Abbildung 33**. Die Nanomechanik in der jeweiligen Stelle ist als lokaler E-Modul dargestellt. Die roten Pfeile markieren besondere Stellen und sind im Text genauer erklärt..... 97

Literaturverzeichnis

1. Patricia Cameron, K.V., Rolf Buschmann, *Aus dem Labor auf den Teller*, Y. Weber, Editor. 2018, Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland e.V (BUND): Berlin.
2. Monteiro, D.R., et al., *The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2009. **34**(2): p. 103-110.
3. Chernousova, S. and M. Epple, *Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal*. Angewandte Chemie-International Edition, 2013. **52**(6): p. 1636-1653.
4. Nowack, B., H.F. Krug, and M. Height, *120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers*. Environmental Science & Technology, 2011. **45**(4): p. 1177-1183.
5. Smijs, T.G. and S. Pavel, *Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness*. Nanotechnology, science and applications, 2011. **4**: p. 95-112.
6. Awad, W.H., et al., *Material properties of nanoclay PVC composites*. Polymer, 2009. **50**(8): p. 1857-1867.
7. Pérez-Herrero, E. and A. Fernández-Medarde, *Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2015. **93**: p. 52-79.
8. Lee, E.J., N.K. Lee, and I.S. Kim, *Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016. **106**: p. 157-171.
9. Wicki, A., et al., *Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications*. Journal of Controlled Release, 2015. **200**: p. 138-157.
10. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nat Nano, 2007. **2**(12): p. 751-760.
11. Boisselier, E. and D. Astruc, *Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity*. Chemical Society Reviews, 2009. **38**(6): p. 1759-1782.
12. Feynman, R.P., *There's plenty of room at the bottom*. California Institute of Technology, Engineering and Science magazine, 1960.
13. Drexler, K.E., *Engines of creation*. 1990: New York.
14. Mock, J.J., et al., *Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles*. Journal of Chemical Physics, 2002. **116**(15): p. 6755-6759.
15. Anker, J.N., et al., *Biosensing with plasmonic nanosensors*. Nature Materials, 2008. **7**(6): p. 442-453.
16. Elsaesser, A. and C.V. Howard, *Toxicology of nanoparticles*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. **64**(2): p. 129-137.
17. Fischer, H.C. and W.C.W. Chan, *Nanotoxicity: the growing need for in vivo study*. Current Opinion in Biotechnology, 2007. **18**(6): p. 565-571.
18. Oberdorster, G., V. Stone, and K. Donaldson, *Toxicology of*

- nanoparticles: A historical perspective.* Nanotoxicology, 2007. **1**(1): p. 2-25.
19. Sharifi, S., et al., *Toxicity of nanomaterials.* Chemical Society Reviews, 2012. **41**(6): p. 2323-2343.
 20. Binnig, G. and H. Rohrer, *Scanning Tunneling Microscopy.* Helvetica Physica Acta, 1983. **56**(1-3): p. 481-482.
 21. Binnig, G. and H. Rohrer, *Gerät zur rasterartigen Oberflächenuntersuchung unter Ausnutzung des Vakuum-Tunneleffekts bei kryogenischen Temperaturen.* 1979, International Business Machines Corp.
 22. Binning, G., et al., *Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy.* Physical Review Letters, 1982. **49**(1): p. 57-61.
 23. Baratoff, A., G. Binnig, and H. Rohrer, *Scanning Tunneling Microscopy of Semiconductor Surfaces.* Journal of Vacuum Science & Technology B, 1983. **1**(3): p. 703-704.
 24. Binnig, G. and H. Rohrer, *Surface Imaging by Scanning Tunneling Microscopy.* Ultramicroscopy, 1983. **11**(2-3): p. 157-160.
 25. Binnig, G. and H. Rohrer, *Scanning Tunneling Microscopy, an Atomic Probe.* Scanning Electron Microscopy, 1983: p. 1079-1082.
 26. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope.* Physical Review Letters, 1986. **56**(9): p. 930-933.
 27. Anselmetti, D., et al., *Attractive-Mode Imaging of Biological-Materials with Dynamic Force Microscopy.* Nanotechnology, 1994. **5**(2): p. 87-94.
 28. Garcia, R. and R. Perez, *Dynamic atomic force microscopy methods.* Surface Science Reports, 2002. **47**(6-8): p. 197-301.
 29. Maivald, P., et al., *Using force modulation to image surface elasticities with the atomic force microscope.* Nanotechnology, 1991. **2**(2): p. 103-106.
 30. Garcia, R. and E.T. Herruzo, *The emergence of multifrequency force microscopy.* Nat Nano, 2012. **7**(4): p. 217-226.
 31. Shekhawat, G.S. and V.P. Dravid, *Nanoscale imaging of buried structures via scanning near-field ultrasound holography.* Science, 2005. **310**(5745): p. 89-92.
 32. Soliman, M., Y. Ding, and L. Tetard, *Nanoscale subsurface imaging.* Journal of Physics-Condensed Matter, 2017. **29**(17).
 33. Appel, C., et al., *Structural Properties and Magnetic Ordering in 2D Polymer Nanocomposites: Existence of Long Magnetic Dipolar Chains in Zero Field.* Langmuir, 2019. **35**(37): p. 12180-12191.
 34. Grefe, A.K., et al., *Oriented crystallization of PEG induced by confinement in cylindrical nanopores: structural and thermal properties.* Soft Matter, 2019. **15**(15): p. 3149-3159.
 35. Stühn, L., J. Auernhammer, and C. Dietz, *pH-depended protein shell dis- and reassembly of ferritin nanoparticles revealed by atomic force microscopy.* Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 17755.
 36. Amiri, A., et al., *Structural analysis of healthy and cancerous epithelial-type breast cells by nanomechanical spectroscopy allows us to obtain peculiarities of the skeleton and junctions.* Nanoscale Advances, 2019. **1**(12): p. 4853-4862.

37. Stuhn, L., et al., *Nanomechanical sub-surface mapping of living biological cells by force microscopy*. *Nanoscale*, 2019. **11**(27): p. 13089-13097.
38. Rugar, D., et al., *Force Microscope Using a Fiber-Optic Displacement Sensor*. *Review of Scientific Instruments*, 1988. **59**(11): p. 2337-2340.
39. Giessibl, F.J., *High-speed force sensor for force microscopy and profilometry utilizing a quartz tuning fork*. *Applied Physics Letters*, 1998. **73**(26): p. 3956-3958.
40. Sader, J.E., J.W.M. Chon, and P. Mulvaney, *Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers*. *Review of Scientific Instruments*, 1999. **70**(10): p. 3967-3969.
41. Kiracofe, D., et al., *High efficiency laser photothermal excitation of microcantilever vibrations in air and liquids*. *Review of Scientific Instruments*, 2011. **82**(1): p. 013702.
42. Vorbringer-Dorozhovets, N., *Laserinterferometrisches Rasterkraftmikroskop*, in *Fakultät für Maschinenbau*. 2019, Technische Universität Ilmenau: Ilmenau.
43. Schröter, K., et al., *Quantitative Analysis of Scanning Force Microscopy Data Using Harmonic Models*. *Macromolecules*, 2009. **42**(4): p. 1114-1124.
44. Clausen-Schaumann, H., et al., *Force spectroscopy with single biomolecules*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2000. **4**(5): p. 524-530.
45. Hertz, H., *Ueber die Berührung fester elastischer Körper*. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*, ed. L. Kronecker and K. Weierstrass. Vol. 92. 1882, Berlin: Verlag Georg Reimer.
46. Sneddon, I.N., *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. *International Journal of Engineering Science*, 1965. **3**(1): p. 47-57.
47. Johnson, K.L., et al., *Surface energy and the contact of elastic solids*. *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences*, 1971. **324**(1558): p. 301-313.
48. Nguyen, H.K., S. Fujinami, and K. Nakajima, *Elastic modulus of ultrathin polymer films characterized by atomic force microscopy: The role of probe radius*. *Polymer*, 2016. **87**: p. 114-122.
49. Derjaguin, B.V., V.M. Muller, and Y.P. Toporov, *Effect of Contact Deformations on the Adhesion of Particles*. *Progress in Surface Science*, 1994. **45**(1-4): p. 131-143.
50. Derjaguin, B.V., V.M. Muller, and Y.P. Toporov, *Effect of contact deformations on the adhesion of particles*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1975. **53**(2): p. 314-326.
51. Tabor, D., *Surface Forces and Surface Interactions*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1977. **58**(1): p. 2-13.
52. Maugis, D., *Adhesion of Spheres - the Jkr-Dmt Transition Using a Dugdale Model*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1992. **150**(1): p. 243-269.
53. Oliver, W.C. and G.M. Pharr, *An Improved Technique for Determining Hardness and Elastic-Modulus Using Load and Displacement Sensing Indentation Experiments*. *Journal of*

- Materials Research, 1992. **7**(6): p. 1564-1583.
54. Durst, K., M. Goken, and M. Fachausschuss Metallographie der Deutschen Gesellschaft für. *Nanoindentierung - eine Sonde für die lokalen mechanischen Eigenschaften.* in **38**, *Metallographie-Tagung; Fortschritte in der Metallographie.* 2004. Frankfurt; Berlin: Werkstoff-Informationsgesellschaft;.
 55. Grienpelt, M., G. Krämer, and B. Cappella, *Comparison of nanoindentation and AFM methods for the determination of mechanical properties of polymers.* Polymer Testing, 2013. **32**(3): p. 455-460.
 56. Johnson, K.L. and J.A. Greenwood, *An Adhesion Map for the Contact of Elastic Spheres.* Journal of Colloid and Interface Science, 1997. **192**(2): p. 326-333.
 57. Lozano, J.R. and R. Garcia, *Theory of multifrequency atomic force microscopy.* Physical Review Letters, 2008. **100**(7).
 58. Raman, A., J. Melcher, and R. Tung, *Cantilever dynamics in atomic force microscopy.* Nano Today, 2008. **3**(1-2): p. 20-27.
 59. García, R., *Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy.* 2011: Wiley.
 60. Stark, R.W., T. Drobek, and W.M. Heckl, *Tapping-mode atomic force microscopy and phase-imaging in higher eigenmodes.* Applied Physics Letters, 1999. **74**(22): p. 3296-3298.
 61. Stark, R.W. and W.M. Heckl, *Higher harmonics imaging in tapping-mode atomic-force microscopy.* Review of Scientific Instruments, 2003. **74**(12): p. 5111-5114.
 62. Li, J.W., J.P. Cleveland, and R. Proksch, *Bimodal magnetic force microscopy: Separation of short and long range forces.* Applied Physics Letters, 2009. **94**(16).
 63. Piramanayagam, S.N., *Perpendicular recording media for hard disk drives.* Journal of Applied Physics, 2007. **102**(1).
 64. Narayanan, S., et al., *On the structure and chemistry of iron oxide cores in human heart and human spleen ferritins using graphene liquid cell electron microscopy.* Nanoscale, 2019. **11**(36): p. 16868-16878.
 65. Savitzky, A. and M.J.E. Golay, *Smoothing + Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures.* Analytical Chemistry, 1964. **36**(8): p. 1627-&.
 66. Ercius, P., et al., *Electron Tomography: A Three-Dimensional Analytic Tool for Hard and Soft Materials Research.* Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.), 2015. **27**(38): p. 5638-5663.
 67. Midgley, P.A. and R.E. Dunin-Borkowski, *Electron tomography and holography in materials science.* Nature Materials, 2009. **8**(4): p. 271-280.
 68. Flannery, B.P., et al., *3-Dimensional X-Ray Microtomography.* Science, 1987. **237**(4821): p. 1439-1444.
 69. Salvo, L., et al., *3D imaging in material science: Application of X-ray tomography.* Comptes Rendus Physique, 2010. **11**(9-10): p. 641-649.
 70. Mobus, G. and B.J. Inkson, *Nanoscale tomography in materials science.* Materials Today, 2007. **10**(12): p. 18-25.
 71. Jain, P.K., et al., *Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and*

- Medicine. Accounts of Chemical Research*, 2008. **41**(12): p. 1578-1586.
72. Mayer, K.M. and J.H. Hafner, *Localized Surface Plasmon Resonance Sensors*. Chemical Reviews, 2011. **111**(6): p. 3828-3857.
 73. Saha, K., et al., *Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing*. Chemical Reviews, 2012. **112**(5): p. 2739-2779.
 74. Dreaden, E.C., et al., *The golden age: gold nanoparticles for biomedicine*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(7): p. 2740-2779.
 75. Dastjerdi, R. and M. Montazer, *A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: Focus on anti-microbial properties*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 2010. **79**(1): p. 5-18.
 76. Bobo, D., et al., *Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date*. Pharmaceutical Research, 2016. **33**(10): p. 2373-2387.
 77. Patra, J.K., et al., *Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects*. Journal of Nanobiotechnology, 2018. **16**.
 78. Bedanta, S. and W. Kleemann, *Supermagnetism*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2009. **42**(1).
 79. Blodgett, K.B., *Monomolecular films of fatty acids on glass*. Journal of the American Chemical Society, 1934. **56**(2): p. 495-495.
 80. Decher, G., *Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites*. science, 1997. **277**(5330): p. 1232-1237.
 81. Pastor-Satorras, R. and J.M. Rubi, *Particle-Cluster Aggregation with Dipolar Interactions*. Physical Review E, 1995. **51**(6): p. 5994-6003.
 82. Vorobiev, A., et al., *Substantial Difference in Ordering of 10, 15, and 20 nm Iron Oxide Nanoparticles on a Water Surface: In Situ Characterization by the Grazing Incidence X-ray Scattering*. Langmuir, 2015. **31**(42): p. 11639-11648.
 83. Mors, P.M., R. Botet, and R. Jullien, *Cluster Cluster Aggregation with Dipolar Interactions*. Journal of Physics a-Mathematical and General, 1987. **20**(15): p. L975-L980.
 84. Perez-Mitta, G., et al., *Molecular Design of Solid-State Nanopores: Fundamental Concepts and Applications*. Advanced Materials, 2019. **31**(37).
 85. Hossain, U.H., et al., *SAXS investigation of un-etched and etched ion tracks in polycarbonate*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms, 2017. **409**: p. 293-297.
 86. Kuttich, B., et al., *Tailored nanochannels of nearly cylindrical geometry analysed by small angle X-ray scattering*. Applied Physics A, 2014. **114**(2): p. 387-392.
 87. Hadley, A., et al., *Analysis of nanometer-sized aligned conical pores using small-angle x-ray scattering*. Physical Review Materials, 2020. **4**(5): p. 056003.
 88. Hutter, J.L. and J. Bechhoefer, *Calibration of Atomic-Force Microscope Tips*. Review of Scientific Instruments, 1993. **64**(7): p. 1868-1873.
 89. Lozano, J.R., et al., *Calibration of higher eigenmode spring constants of atomic force microscope cantilevers*.

- Nanotechnology, 2010. **21**(46): p. 465502.
90. *Chemical Retrieval on the Web (CROW)*. 2020 [cited 2020 2020]; Available from: <https://polymerdatabase.com/>.
 91. Herruzo, E.T., A.P. Perrino, and R. Garcia, *Fast nanomechanical spectroscopy of soft matter*. Nature Communications, 2014. **5**.
 92. Matsen, M.W. and F.S. Bates, *Unifying weak- and strong-segregation block copolymer theories*. Macromolecules, 1996. **29**(4): p. 1091-1098.
 93. Martin, Y. and H.K. Wickramasinghe, *Magnetic imaging by "force microscopy" with 1000 Å resolution*. Applied Physics Letters, 1987. **50**(20): p. 1455-1457.
 94. Schönenberger, C. and S.F. Alvarado, *Understanding magnetic force microscopy*. Zeitschrift für Physik B Condensed Matter, 1990. **80**(3): p. 373-383.
 95. Johnson, K.E., *Magnetic materials and structures for thin-film recording media (invited)*. Journal of Applied Physics, 2000. **87**(9): p. 5365-5370.
 96. Pa, P.S., *A removing process for multilayer nano thin-film structures on the hard disk surface*. International Journal of Advanced Manufacturing Technology, 2014. **70**(1-4): p. 459-467.
 97. Gavrilă, H., *Patterned magnetic recording media*. Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, 2008. **10**(4): p. 757-767.
 98. Michel, F.M., et al., *The structure of ferrihydrite, a nanocrystalline material*. Science, 2007. **316**(5832): p. 1726-1729.
 99. Papaefthymiou, G.C., *The Mossbauer and magnetic properties of ferritin cores*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2010. **1800**(8): p. 886-897.
 100. Chasteen, N.D., *Ferritin. Uptake, storage, and release of iron*. Metal Ions in Biological Systems, Vol 35, 1998. **35**: p. 479-514.
 101. Chasteen, N.D. and P.M. Harrison, *Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage*. Journal of Structural Biology, 1999. **126**(3): p. 182-194.
 102. Lewin, A., G.R. Moore, and N.E. Le Brun, *Formation of protein-coated iron minerals*. Dalton Transactions, 2005(22): p. 3597-3610.
 103. Wilhelm, S., et al., *Analysis of nanoparticle delivery to tumours*. Nature Reviews Materials, 2016. **1**(5).
 104. Jutz, G., et al., *Ferritin: A Versatile Building Block for Bionanotechnology*. Chemical Reviews, 2015. **115**(4): p. 1653-1701.
 105. Stefanini, S., et al., *Thermal stability of horse spleen apoferritin and human recombinant H apoferritin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **325**(1): p. 58-64.
 106. Ohnishi, S., et al., *Direct Visualization of Polypeptide Shell of Ferritin Molecule by Atomic-Force Microscopy*. Biophysical Journal, 1993. **65**(2): p. 573-577.
 107. Li, J.W., J.P. Cleveland, and R. Proksch, *Bimodal magnetic force microscopy: Separation of short and long range forces*. Applied Physics Letters, 2009. **94**(16): p. 163118.
 108. Dietz, C., et al., *Nanomechanical coupling enables detection and imaging of 5 nm superparamagnetic*

- particles in liquid. *Nanotechnology*, 2011. **22**(12).
109. Granier, T., et al., *Comparison of the structures of the cubic and tetragonal forms of horse-spleen apoferritin*. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 1997. **53**: p. 580-587.
 110. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Research*, 2000. **28**(1): p. 235-242.
 111. Truffi, M., et al., *Ferritin nanocages: A biological platform for drug delivery, imaging and theranostics in cancer*. *Pharmacological Research*, 2016. **107**: p. 57-65.
 112. Zhen, Z.P., et al., *Ferritins as nanoplatforms for imaging and drug delivery*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2014. **11**(12): p. 1913-1922.
 113. Bhaskar, S. and S. Lim, *Engineering protein nanocages as carriers for biomedical applications*. *Npg Asia Materials*, 2017. **9**: p. 18.
 114. Huang, P., et al., *Dye-Loaded Ferritin Nanocages for Multimodal Imaging and Photothermal Therapy*. *Advanced Materials*, 2014. **26**(37): p. 6401-6408.
 115. Uchida, M., et al., *Biological containers: Protein cages as multifunctional nanoplatforms*. *Advanced Materials*, 2007. **19**(8): p. 1025-1042.
 116. Crichton, R.R. and C.F.A. Bryce, *Subunit Interactions in Horse Spleen Apoferritin - Dissociation by Extremes of Ph*. *Biochemical Journal*, 1973. **133**(2): p. 289-299.
 117. Kim, M., et al., *pH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: disassembly and reassembly*. *Biomacromolecules*, 2011. **12**(5): p. 1629-40.
 118. Necas, D. and P. Klapetek, *Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis*. *Central European Journal of Physics*, 2012. **10**(1): p. 181-188.
 119. Kosmulski, M., *The pH-dependent surface charging and points of zero charge V. Update*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011. **353**(1): p. 1-15.
 120. Kosmulski, M., *The pH dependent surface charging and points of zero charge. VII. Update*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018. **251**: p. 115-138.
 121. Nerurkar, A.V., et al., *Characterization of ferritin from spleens of patients with Hodgkin's disease (HD)*. *Neoplasma*, 1993. **40**(1): p. 31-4.
 122. Suresh, S., *Biomechanics and biophysics of cancer cells*. *Acta Biomaterialia*, 2007. **3**(4): p. 413-438.
 123. Schwering, M., et al., *Far-Field Nanoscopy with Reversible Chemical Reactions*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2011. **50**(13): p. 2940-2945.
 124. Rust, M.J., M. Bates, and X.W. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. *Nature Methods*, 2006. **3**(10): p. 793-795.
 125. Roduit, C., et al., *Stiffness Tomography by Atomic Force Microscopy*. *Biophysical Journal*, 2009. **97**(2): p. 674-677.
 126. Longo, G., et al., *Force volume and stiffness tomography investigation on the dynamics of stiff material under bacterial membranes*.

- Journal of Molecular Recognition, 2012. **25**(5): p. 278-284.
127. A-Hassan, E., et al., *Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy*. Biophysical Journal, 1998. **74**(3): p. 1564-1578.
 128. Heinz, W.F. and J.H. Hoh, *Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope*. Trends in Biotechnology, 1999. **17**(4): p. 143-150.
 129. Dehnert, M. and R. Magerle, *3D depth profiling of the interaction between an AFM tip and fluid polymer solutions*. Nanoscale, 2018. **10**(12): p. 5695-5707.
 130. Uhlig, M.R. and R. Magerle, *Unraveling capillary interaction and viscoelastic response in atomic force microscopy of hydrated collagen fibrils*. Nanoscale, 2017. **9**(3): p. 1244-1256.
 131. Kasas, S., G. Longo, and G. Dietler, *Mechanical properties of biological specimens explored by atomic force microscopy*. Journal of Physics D-Applied Physics, 2013. **46**(13).
 132. Bestembayeva, A., et al., *Nanoscale stiffness topography reveals structure and mechanics of the transport barrier in intact nuclear pore complexes*. Nature Nanotechnology, 2015. **10**(1): p. 60-64.
 133. Yersin, A., et al., *Elastic properties of the cell surface and trafficking of single AMPA receptors in living hippocampal neurons*. Biophysical Journal, 2007. **92**(12): p. 4482-4489.
 134. Alsteens, D., et al., *Nanomechanical mapping of first binding steps of a virus to animal cells*. Nature Nanotechnology, 2017. **12**(2): p. 177-183.
 135. Roduit, C., et al., *OpenFovea: open-source AFM data processing software*. Nature Methods, 2012. **9**(8): p. 774-775.
 136. Dinarelli, S., M. Girasole, and G. Longo, *FC_analysis: a tool for investigating atomic force microscopy maps of force curves*. BMC Bioinformatics, 2018. **19**.
 137. Galluzzi, M., et al., *Atomic force microscopy methodology and AFMech Suite software for nanomechanics on heterogeneous soft materials*. Nature Communications, 2018. **9**.
 138. MATLAB 2018b. 2018, The MathWorks, Inc.: Natick, MA.
 139. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 671-675.
 140. Community, B.O., *Blender - a 3D modelling and rendering package*. 2018, Blender Foundation.
 141. Antonacci, G. and S. Braakman, *Biomechanics of subcellular structures by non-invasive Brillouin microscopy (vol 6, pg 37217, 2016)*. Scientific Reports, 2017. **7**.
 142. Picas, L., F. Rico, and S. Scheuring, *Direct Measurement of the Mechanical Properties of Lipid Phases in Supported Bilayers*. Biophysical Journal, 2012. **102**(1): p. L1-L3.
 143. Majewska, M., et al., *Nanomechanical characterization of single phospholipid bilayer in ripple phase with PF-QNM AFM*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2020. **1862**(9).
 144. Garcia, P.D. and R. Garcia, *Determination of the viscoelastic properties of a single cell cultured on a*

- rigid support by force microscopy*. Nanoscale, 2018. **10**(42): p. 19799-19809.
145. Garcia, P.D. and R. Garcia, *Determination of the Elastic Moduli of a Single Cell Cultured on a Rigid Support by Force Microscopy*. Biophysical Journal, 2018. **114**(12): p. 2923-2932.
 146. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-+.
 147. Lingwood, D. and K. Simons, *Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle*. Science, 2010. **327**(5961): p. 46-50.
 148. Amo, C.A. and R. Garcia, *Fundamental High-Speed Limits in Single-Molecule, Single-Cell, and Nanoscale Force Spectroscopies*. ACS Nano, 2016. **10**(7): p. 7117-7124.
 149. Wang, Z. and A. Cuschieri, *Tumour Cell Labelling by Magnetic Nanoparticles with Determination of Intracellular Iron Content and Spatial Distribution of the Intracellular Iron*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(5): p. 9111.
 150. Rodzinski, A., et al., *Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles*. Scientific Reports, 2016. **6**.
 151. Torrice, M., *Does nanomedicine have a delivery problem?* Chemical & Engineering News, 2016. **94**(25): p. 16-19.
 152. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. Journal of Controlled Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-284.
 153. Lichtman, J.W. and J.-A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nature Methods, 2005. **2**(12): p. 910-919.
 154. Hell, S.W., *Far-field optical nanoscopy*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1153-1158.
 155. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nature Biotechnology, 2003. **21**(11): p. 1368-1376.
 156. Dietz, C., *Sensing in-plane nanomechanical surface and sub-surface properties of polymers: local shear stress as function of the indentation depth*. Nanoscale, 2018. **10**(1): p. 460-468.
 157. Stark, R.W., *Getting a feeling for the nanoworld*. Nature Nanotechnology, 2007. **2**(8): p. 461-462.